Agriculture and Agri-Food Canada

Agriculture et Agroalimentaire Canada

The 3rd Milky Way Meeting

SCIENCE SERVING THE INDUSTRY

Canada

102-06377/

The Milky Way Meetings want to showcase the Canadian research in dairy production. The original concept came from the researchers in dairy production at the Dairy and Swine Research and Development Centre of Agriculture and Agri-Food Canada in Lennoxville, Quebec. This event would not be possible without the precious collaboration of the Dairy Farmers of Canada.

Dairy Farmers of Canada

Les Producteurs laitiers du Canada

Canada

The Development of a DNA Vaccine Against Bovine Viral Diarrhea

Brian G.Talbot
Department of Biology, Université de Sherbrooke

- BVD is a widespread, costly disease against which ordinary vaccines can fail.
- A DNA vaccine against BVD will provide a cheap and safe way to control this disease.

Bovine viral diarrhea virus (BVDV) is one of the most persistent and widespread bovine pathogens found worldwide. It occurs in several forms and thus can cause a variety of diseases which vary from acute hemorrhage to a mild diarrhea. The vaccines that are available do not necessarily protect against new strains of the virus. Such a new strain caused an epidemic in 1993 that killed almost 25% of the calves in Quebec.

DNA vaccines, once they are available, will be cheaper, more stable, easier to produce and will hopefully provide better protection than previous ones. The objective of this research project was to determine if a new type of vaccine, a DNA vaccine, could be developed against BVDV.

Here is how a DNA vaccine works. An anti-virus DNA vaccine consists of a small circular piece of DNA (a plasmid) derived from a harmless bacteria and into which a fragment of DNA from a virus has been inserted. When this plasmid is injected into the skin or the muscle of the calf, the DNA enters the cells and is used to produce a small viral protein or proteins. These are totally harmless, but the immune system sees them as foreign invading proteins and produces an immune response: the calves produce antibodies and killer cells. This normal response may take weeks to occur, but the immune system retains a memory of the viral protein. The next time the animal is exposed to the virus, the immune response is almost immediate. The virus, along with the infected cells, are recognized and removed before a harmful infection occurs.

The protein responsible for generating an immune system memory and for protection of the animal against BVDV is called the E2 protein. We inserted the gene for this protein into a plasmid. We made sure that the E2 protein was produced after the plasmid was transferred into bovine cells in culture. We then injected the plasmid into mice. These mice produced a stronger antibody response than mice injected with a commercial anti-BVDV vaccine. The vaccine was then tested on 7-month old cattle. We used two types of preparation of the vaccine, either as naked DNA (N-DNA) or as DNA bound up in small fat-based structures called liposomes (L-DNA). These are supposed to help penetration of the plasmid into the cells. There was a very strong antibody response to the L-DNA and a weaker one to the N-DNA. However, the killer cell response was stronger in the N-DNA immunized animals than in the L-DNA immunized group. When the animals were exposed to the BVDV, the three animals immunized with N-DNA developed little or no signs of disease. All the others including the L-DNA immunized animals showed typical symptoms of BVDV infection. We have since repeated this work with 4-week old calves using immunization with N-DNA. We injected twice with the DNA vaccine, followed with inactivated virus as an ordinary vaccine. Five of the 8 vaccinated animals were completely protected from subsequent infection and the other three had drastically reduced symptoms. Control, non-vaccinated calves got sick.

Presently we are working to increase the efficiency and scope of the vaccine both by the addition of genes from other strains of the virus and genes that are present in all strains of the virus.

Biographical notes

Brian Talbot

Brian Talbot is a Professor in the Department of Biology of Université de Sherbrooke. His research interests are the establishment of immunoassays using monoclonal antibodies and the study of new vaccine technologies against viruses and bacteria. He obtained his B.Sc. (Hons) in Applied Biochemistry from Bath University, England and his Ph.D. in Chemistry (Biochemistry) from the University of Calgary, Alberta. He has done some postdoctoral work at University of Guelph in Environmental Sciences and Université de Sherbrooke in Microbiology and Genetics. Between 1984 and 1986, he was Director of the Monoclonal Antibody Laboratory at the Université de Sherbrooke. Since 1997, Dr. Talbot is also Adjunct Professor in the Department of Pathology and Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, Université de Montréal.

Brian Talbot
Department of Biology
Faculty of Sciences
Université de Sherbrooke
2500, boul. de l'Université
Sherbrooke, QC J1K 2R1

Phone : (819) 821-8000 ext. 2065
Fax : (819) 821-8049
email: btalbot@courrier.usherb.ca

Developing a DNA vaccine against bovine viral diarrhea virus (BVDV)

Dr. Brian G. Talbot, Ph.D.
Université de Sherbrooke

The problem with vaccines...

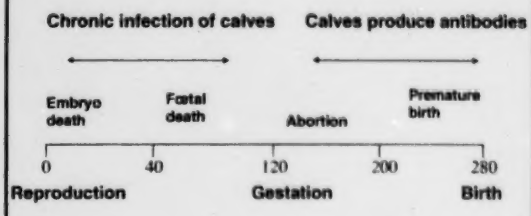
If they work,

nothing happens...

BVDV disease

- Clinical signs
  - **high fever**
  - **less blood platelets**
  - **diarrhea**
  - **hemorrhage**
  - **death**
- Economic losses
  - **several million $**
  - **mortality: 5% in 1991, 35% in 1993**

BVDV effects vary with time of infection and virulence of virus



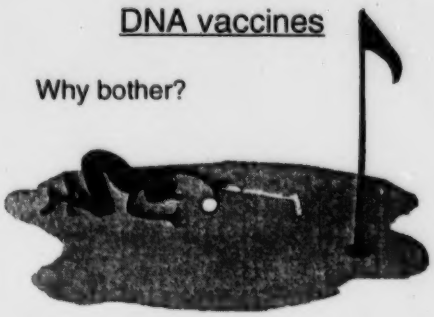
The worst case

Vaccination and BVDV

- 100+ commercial vaccines on the American market
- variable efficiency and do not protect against new strains
- recombinant vaccines or subunit vaccines:TOO EXPENSIVE!!

DNA vaccines

Why bother?



DNA vaccination news Summer 2000

6 Sept U.S. Navy begins additional clinical trial of **Malaria DNA Vaccine** with bioject delivery system

5 Sept Britain starts human trials of **AIDS vaccine**

24 Aug Bacterial DNA **allergy vaccine** to be further tested in humans

16 Aug EpiVax and Brown University team announce not for profit **HIV vaccine** project

9 Aug 'Naked DNA' vaccine fights **arthritis and MS** in lab animals

DNA vs classical vaccines

Properties	**Type of vaccine**	
	Weakened pathogen	DNA vaccine
Stability	-	+
Cost of prod.	+ / -	-
Cost of dev.	-	+
Safety	-	+
Neonatal vaccination	-	+
Combination of diseases	-	+

How a DNA vaccine works

1. Clone the gene for the protein

How a DNA vaccine works

2. Plasmid expression vector

1. Clone the gene for the protein

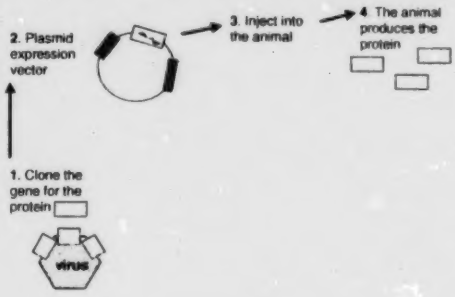
How a DNA vaccine works

2. Plasmid expression vector

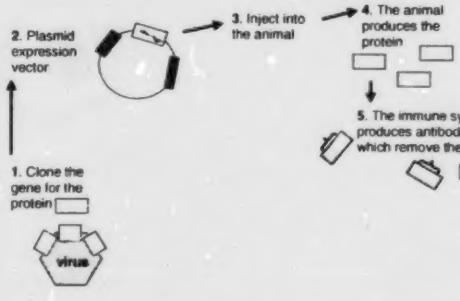
3. Inject into the animal

1. Clone the gene for the protein

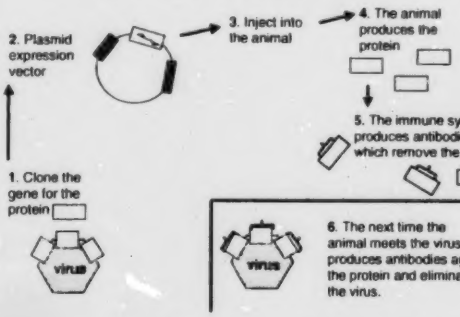
How a DNA vaccine works


2. Plasmid expression vector
3. Inject into the animal
4. The animal produces the protein
1. Clone the gene for the protein
virus

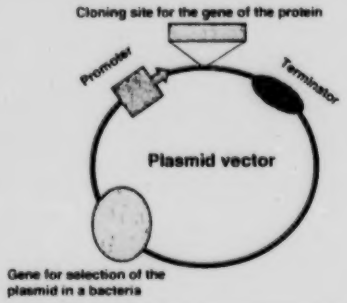
How a DNA vaccine works


2. Plasmid expression vector
3. Inject into the animal
4. The animal produces the protein
5. The immune system produces antibodies which remove the protein
1. Clone the gene for the protein
virus

How a DNA vaccine works


2. Plasmid expression vector
3. Inject into the animal
4. The animal produces the protein
5. The immune system produces antibodies which remove the protein
1. Clone the gene for the protein
virus
virus
6. The next time the animal meets the virus, it produces antibodies against the protein and eliminates the virus.

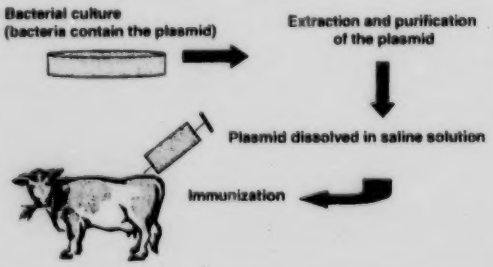
DNA vaccine expression vector


Cloning site for the gene of the protein
Promoter
Terminator
Plasmid vector
Gene for selection of the plasmid in a bacteria

Objective: to produce a DNA vaccine to protect calves against BVDV

- Identify the most promising gene
- make the appropriate plasmid
- check it in cell cultures
- immunize mice (delivery system?)
- identify the production of neutralizing antibodies to BVDV
- repeat in cattle
- improve the efficiency in cattle

Production and use of a DNA vaccine



Two types of immune response

- Production of antibodies which remove microbes in the blood or the tissues outside the cell.
- Production of cytotoxic cells (CTL) which kill infected cells of the animal.

How to choose immunization methods for DNA vaccination

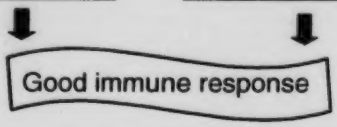
• High antibody response	• Intradermic
• high cytotoxic cell response	• intramuscular
• mixed response	• intramuscular

First in vivo studies (mice)

- Immunization
  - **intramuscular**
  - **intradermic**
- boost immunization after 2 weeks
- blood samples at 1, 3, 5 weeks

Length of immune response

DNA vaccine | **Attenuated virus**



Even after 6 months!!!

Plasmid delivery by liposomes

- Protect from degradation
- enhance cell uptake
- enhance entry into nucleus
- target to specific cells
- approved by FDA

Bovine immunization

- Vaccines: naked or with liposome
- intramuscular injection
- boosts on week 3 and 6
- challenge on the 16th week

Neutralizing antibodies

Treatment	Vaccination period (week)					Challenge period (week)			
	0	6	8	10	12	16	17	18	19
L-DNA (1- 3)	-	-	+	+	+	+	+	+	+
N-DNA (3)	-	-	-	+	+	+	+	+	+

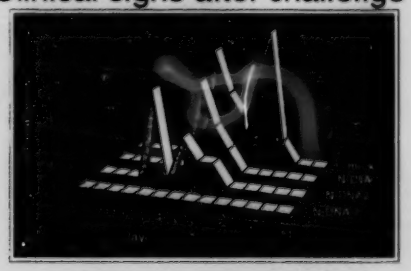
Controls were negative

Nasal secretion of neutralizing antibodies

Treatment	Antibody strength	
	BVDV type1	BVDV type 2
L-DNA	+++	+
N-DNA	+++	+

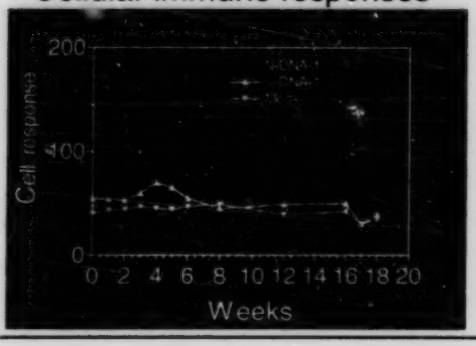
Controls were negative

Clinical signs after challenge



L-DNA immunized animals showed no protection

Cellular immune responses



Second generation vaccine

- Will contain E2 and other antigen of type I and II virus
- plasmid will include bovine immune response stimulant
- plasmid will include 3 extra high response DNA sequences
- injection will be intramuscular

Cost of DNA vaccine development

- From idea to protective prototype in lab animals: **$300,000**
- From prototype to final formulation and field testing in cattle: **$600,000**

The DNA vaccine team

- Université de Sherbrooke
- Brian Talbot, Ph.D.
- Steve St Onge, MSc.

- Université de Montréal
- Youssef Elazhary, DMV, Ph.D.
- Sylvette St Laurent, Ph.D.
- Serge Harpin, Ph.D.
- Majambu Mbikay, Ph.D.

Present DNA vaccine team

- **Université de Sherbrooke**
  - Brian Talbot, Ph.D.
  - Luizim Shkreta, Ph.D.
  - Eric Brouillette, MSc
- **Lennoxville Dairy and Swine R & D Centre**
  - Pierre Lacasse, Ph.D.
  - Moussa Diarra, Ph.D.

- **Université de Montréal**
  - Youssef Elazhary, DMV, Ph. D.
  - Sylvette St Laurent, Ph. D.
  - Majambu Mbikay, Ph. D.

The Potential for Peroxide-Based Products to Clean Milking Equipment

Susan Springthorpe, Richard Kibbee and Syed A. Sattar
Centre for Research on Environmental Microbiology, University of Ottawa

- Conventional cleaning and sanitation of milking lines, including use of chlorine, causes obvious cracking in the surface of black rubber inflations.
- Black rubber inflations treated with a hydrogen peroxide-based product show no obvious cracking but some surface softening; field tests are needed to determine if this would affect rubber durability.
- Sanitation with either chlorine or the hydrogen peroxide-based product was equivalent.
- Heat is the most important component of line sanitation.

Research was initiated to determine whether chlorine was the cause of the black inking problem and to determine whether use of a hydrogen peroxide-based formulation would avoid this problem. Also, if such an alternate product is used, can equivalent cleaning and sanitation be achieved? This is an important criterion for acceptance of an alternate technology. In addition to avoiding a potential black inking problem, one of the principal reasons for considering hydrogen peroxide technology is the lack of toxic residues after significant product dilution. Additional benefits to farmers could include using less water since the number of washing stages needed are reduced.

Sections of black rubber inflations were subjected to daily cleaning cycles with the two cleaning and sanitizing regimes in parallel for a period of three months. Scanning electron microscopic photographs of the interior surfaces of the inflations were taken at regular intervals to examine any progressive changes in the integrity and microtopography of the rubber surfaces. These photographs showed progressive cracking of the surfaces of the rubber inflations after treatment with the chlorine-based regime. No such cracking was observed with the hydrogen peroxide technology but there was some evidence of softening and smoothing of the surface.

In vitro tests compared the activity of the two sanitizers against typical Gram negative and Gram positive bacteria, deposited on or grown as biofilms on the surface of rubber coupons. These tests suggested that the potency and efficacy of the two sanitizer components were similar. Additional tests, also conducted in parallel with the two sanitizers, compared the disinfection achieved in a simulated use test after circulation of raw milk for one hour prior to cleaning and sanitation. Here again, similar results were obtained with both sanitizers. Experiments were conducted at a range of temperatures. At higher temperatures there were very few surviving microorganisms using either method but as the temperatures were dropped closer to 40°C, more surviving microorganisms were observed in both systems.

Our results support a potential role for peroxide-based sanitizers in the dairy industry, but suitable field trials would be a necessary sequel to this study.

Biographical notes

Susan Springthorpe

Susan Springthorpe is a Research Associate at the University of Ottawa and Director of Research with the Centre for Research in Environmental Microbiology. She earned university degrees in Sheffield (UK) and Ottawa and has been working in Environmental Microbiology for about 30 years. She specializes in environmental control and disinfection issues and is the author of a number of published works on cleaning, disinfection and sterilization.

Susan Springthorpe, Associate Director
Centre for Research on Environmental Microbiology [CREM]
Department of Biochemistry, Microbiology & Immunology
University of Ottawa
451 Smyth Road
Ottawa, ON K1H 8M5

Phone: 613-562-5800 ext. 8313
Fax: 613-562-5452/5610
Email: sspring@uottawa.ca

The Potential for Peroxide-Based Products to Clean Milking Equipment

Susan Springthorpe, Richard Kibbee and Syed A. Sattar

Centre for Research on Environmental Microbiology
University of Ottawa

Introduction & Background

- Black specks in milk - black inking
- Nature of the problem
  - effect of chlorine on black rubber?
  - overuse of rubber components?
- Can problem be avoided with use of alternate sanitizer ?
- Can H_2O_2 be equivalent?

Study Objectives

- To determine if hydrogen peroxide-based products could be suitable alternate sanitizers to chlorine for use in the dairy industry.
- To determine, through parallel studies of chlorine and a formulation using an accelerated and stabilized hydrogen peroxide technology, whether the alternate sanitizer prevents 'black inking' and provides an equivalent microbial kill.

Comparison of sanitizers

200 ppm chlorine	accelerated hydrogen peroxide
oxidizer - fast acting	oxidizer - fast acting
readily neutralized needs clean surfaces	acts as a cleaner and sanitizer
concentration limited because food contact	higher concentration for food contact
alkaline	weak acid
toxic residuals	no toxic residuals

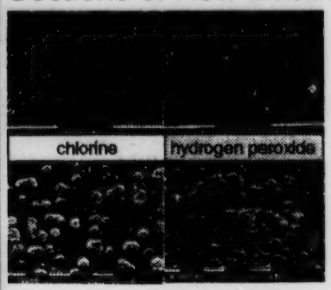
Study Stages

- **Rubber integrity**
  - inflation walls, daily exposure to each sanitizing regime in parallel for 123 days - visual and electron microscopic evaluation
  - rubber hose in raw milk study - macroscopic examination of swabs for evidence of rubber breakdown
- **Sanitizer efficacy comparisons**
  - laboratory grown organisms on rubber coupons
  - organisms in raw milk at different operating temperatures

Integrity of Rubber Inflations

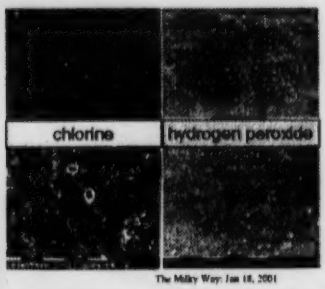
- New inflations - cylindrical section
- Parallel tests with two sanitizing regimes
- One conventional chlorine cycle per day but 20 minutes exposure to chlorine
- One modified cycle for hydrogen peroxide
  - warm water rinse, 550 ppm H_2O_2 left till next 'milking', 275 ppm for 20 minutes (no neutralizer needed)
- 4-month study with inflations

Sections of New Inflations



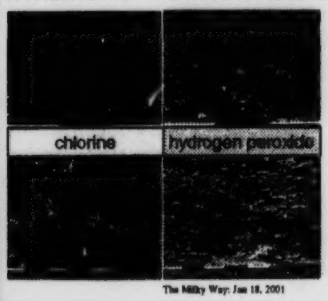
New and unused

Inflations - Simulated Use



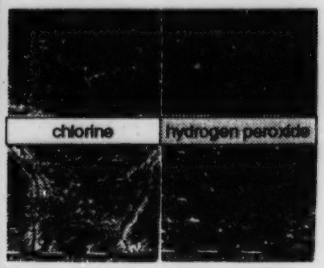
33 days

Inflations - Simulated Use



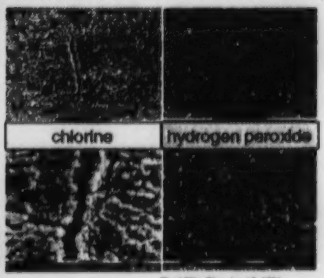
63 days

Inflations - Simulated Use



93 days

Inflations - Simulated Use



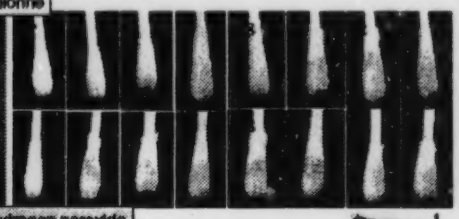
123 days

Integrity of Rubber Hose

- Hose thick walled - difficult to study by SEM
- Integrity monitored as a part of stage using raw milk circulation prior to exposure to sanitizing regime
- Hose connected in sections - two sections removed every 7 days for 56 days
- Sterile swabs used to assess damage to inner surface of hose

Macroscopic Effects on Rubber Hose

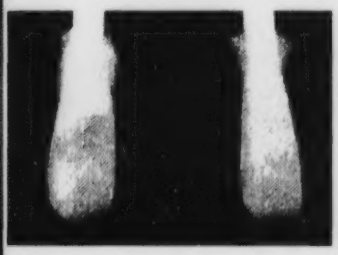
chlorine



hydrogen peroxide

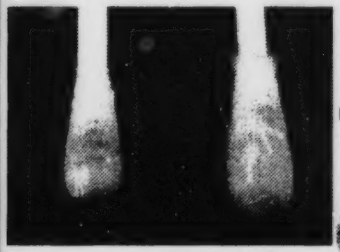
ays of exposure, 2 cycles per day

Effects on Rubber Hose



28 days
[2 cycles per day]

Effects on Rubber Hose

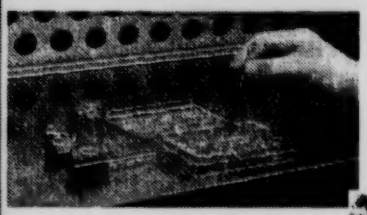


56 days
[2 cycles per day]

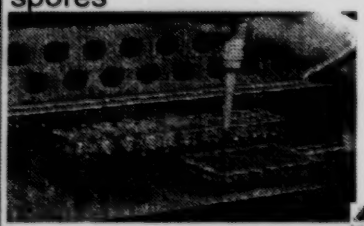
Laboratory grown bacteria

- **Rubber coupons from used inflations**
- **Bacillus subtilis and Clostridium sporogenes spores, Enterococcus faecalis and Staphylococcus aureus - deposited and dried**
- **Pseudomonas aeruginosa - grown (biofilm)**
- **Exposed to disinfectant at defined temperature for 10 or 20 minutes**
- **Survivors filtered and counted, kill assessed relative to untreated controls**

Placing sterile coupons in tray



Inoculating coupons with spores



Recovering survivors from treated coupon

Log reductions - bacteria

Concentration of Disinfectants	S.aureus	S.aureus	S.aureus
200 ppm CT	4.3	6.5	5.0
100 ppm CT	2.1	2.3	1.9
550 ppm H_2O_2	6.4	7.8	7.0
275 ppm H_2O_2	6.6	6.5	6.6

Concentration of Disinfectants	E. faecalis	E. faecalis	E. faecalis
200 ppm CT	4.8	3.2	4.4
100 ppm CT	1.8	1.5	1.7
550 ppm H_2O_2	6.1	6.7	7.6
275 ppm H_2O_2	4.9	5.5	5.6

Concentration of Disinfectants	P.aeruginosa	P.aeruginosa	P.aeruginosa
200 ppm CT	2.8	4.0	2.2
100 ppm CT	2.7	2.1	2.3
550 ppm H_2O_2	6.5	5.9	2.7
275 ppm H_2O_2	2.0	4.8	2.0

contact time was 10 minute at ambient temperature

Log reduction - bacterial spores

Concentrations of Disinfectants	C. sporogenes	C. sporogenes	C. sporogenes
200 ppm CT	4.9	6.2	5.3
100 ppm CT	2.7	2.7	4.1
550 ppm H_2O_2	5.0	4.6	4.5
275 ppm H_2O_2	3.1	3.5	2.9

Concentrations of Disinfectants	B. subtilus	B. subtilus	B. subtilus
200 ppm CT	4.9	6.2	5.3
100 ppm CT	2.7	2.7	4.1
550 ppm H_2O_2	5.0	4.6	4.5
275 ppm H_2O_2	3.1	3.5	2.9

contact time was 20 min. at 60°C

Raw milk experiments

- Raw milk samples obtained daily from farm - colony forming units determined - triplicate
- Experimental unit recycles (peristaltic pump) raw milk, then sanitizing detergents/chemicals - waterbaths keep desired temperatures
- In-line cylinders (stainless steel) linked alternately with short lengths of rubber hose
- Raw milk circulated one hour - then sanitation cycles in parallel with disinfection - ten minute exposure for both - 2 cycles per day
- Sample (cylinders & rubber) weekly after milk and after sanitation

Bacteria recovered - raw milk

Cycle temperature	Disinfectant used in CIP	Organisms Recovered
70°C	chlorine	*Bacillus subtilis* ♦, *Bacillus cereus I* ♦, *Bacillus cereus II* ♦
	hydrogen peroxide	*Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus I*
50°C	chlorine	*Bacillus subtilis Bacillus cereus I, Staphylococcus epidermidis*, ♦ *Staphylococcus sp.* ♦
	hydrogen peroxide	*Bacillus subtilis Bacillus cereus I, Bacillus cereus II, Staphylococcus aureus* ♦, *Staphylococcus sp.*
45°C	chlorine	*Bacillus subtilis Bacillus cereus I, Bacillus cereus II, Bacillus sp., Staphylococcus aureus, Staphylococcus sp., Staphylococcus epidermidis*
	hydrogen peroxide	*Bacillus cereus I, Bacillus sp.* ♦ *Staphylococcus aureus, Staphylococcus sp., Staphylococcus epidermidis*
40°C	chlorine	*Bacillus subtilis Bacillus cereus I, Staphylococcus aureus, Staphylococcus sp., Stenotrophomonas maltophilia* ♦, *Diphtheroid* ♥
	hydrogen peroxide	*Bacillus subtilis, Bacillus cereus II, Staphylococcus aureus, Staphylococcus sp., Staphylococcus epidermidis, Stenotrophomonas maltophilia*

♦ Tentative API 50 CHB
♦ Tentative RAPIDEC staph
♥ Tentative test manual and Gram Stain
♦ Tentative Ottawa General Hospital

Concluding Remarks - Integrity

- Chlorine sanitizing regime causes cracking in black rubber surface of inflations
- Surface of hydrogen peroxide-treated inflations appears smooth and slightly soft
- Both sanitizers have some effects on rubber - no definitive answer on black specks
- Long term field integrity of inflations not known and needs more study

Concluding remarks - sanitizing

- Results obtained with both sanitizers equivalent for tests with laboratory organisms and raw milk - even at temperatures as low as 40°C
- Sanitizing effects need proving in multiple field situations prior to recommending
- Heat is still the best !

Potential Benefits

- Possibly prevent black specks from rubber
- Equivalent or superior disinfection
- Reduce discharge of toxic material to the environment
- Potential water and energy savings
- Potential for more standardization
- Possible cost savings

Acknowledgments

- Harold Cuthbertson
- Dennis McKnight & Albert Koekkoek
- Patrick Lecavalier and Alfa Laval, Canada
- Ron Riley
- Staff of the Dairy Barn at the Central Experimental Farm
- Dairy Farmers of Canada

The ABC of Proteins : From Mouth to Milk!

Hélène Lapierre
Dairy and Swine Research and Development Centre, Agriculture and Agri-Food Canada

- In ruminants, the quantity and the profile of amino acids being supplied to the mammary gland are completely different from those present in the food ingested.
- In order to adequately feed the mammary gland, it becomes essential to be able to determine the total quantity and which amino acids effectively reach the mammary gland.

Component pricing and environmental pressures of the last years favour the optimization of the transfer of the protein from feed to milk. But what exactly is a protein? A protein is a chain of amino acids, and unlike fat and sugars, it contains nitrogen. Twenty amino acids are used to make the thousands of proteins needed in an animal. The amino acids are like the alphabet and proteins are like words. Just as 26 letters are enough to write all the words of an English dictionary, 20 amino acids are enough to build all the proteins. However, as for the letters in a word, the amino acids have to be placed in a very specific order for the protein to fulfill its role. One amino acid cannot replace another. To maximize milk protein production by the mammary gland, it is critical to supply it, not only with the proper total quantity of amino acids but also with the right proportion of individual amino acids.

On average, only 30% of the nitrogen ingested by a dairy cow is transferred into milk protein: 30% is excreted in the feces and 40% in the urine. This relative inefficiency is due to many factors. Non-protein nitrogen is one of them. All amino acids contain nitrogen, but all the nitrogen in the feed is not necessarily present as amino acids. As an example, forage analyses are often misleading. When we test for protein, we actually measure nitrogen. The value obtained is then multiplied by a conversion factor, which is reliable when all the nitrogen is present in the form of proteins. Unfortunately, some silages may contain up to 80% of their nitrogen under a non-protein form. We can compare this nitrogen to letters of a foreign alphabet... for example, Chinese letters cannot help us write an English word! Thanks to the rumen microbes, a fraction of this nitrogen can be converted into amino acids. However, although the rumen microflora is a real plus to the ruminants as it can transform the Chinese characters into English letters, it really complicates the prediction of the quantities and proportions of the different nitrogenous compounds from the diet that will make it to the blood circulation.

Ultimately, it will be the amino acids reaching the blood that will be used by the mammary gland to make milk protein. It therefore becomes essential to quantify the amino acids that will be absorbed. On average, the quantity of useful letters absorbed represents 35 to 40% of all the characters present in the diet. Once in the blood circulation, there is still one major obstacle on the way to the mammary gland : the liver. The liver extracts between 0 and 100% of the amino acids absorbed, depending on the amino acid itself and on the requirements and diet of the animal. Not easy to predict what will finally reach the mammary gland! But, it is only by quantifying this input that we will be able to adjust it to the requirements of the mammary gland.

Biographical notes

Hélène Lapierre

Hélène Lapierre is a research scientist working for Agriculture and Agri-Food Canada at the Dairy and Swine Research and Development Centre in Lennoxville, Quebec. Her research aims at improving the efficiency of nitrogen utilization through a better knowledge of intermediary metabolism of nitrogenous compounds. The outcomes of her research target reduced feeding costs and nitrogen losses in the environment. She obtained her B.Sc. and M.Sc. from Université Laval, her Ph.D. from Université de Sherbrooke and did a post-doctorate at the USDA Research Centre in Beltsville, MD. She has authored/co-authored 55 papers in refereed journals and more than a hundred presentations at scientific and extension meetings.

Hélène Lapierre
Dairy and Swine Research
and Development Centre
P.O. Box 90, 2000 route 108 East
Lennoxville, QC J1M 1Z3

Phone : 819-565-9174, ext. 234
Fax: 819-564-5507
Email : lapierreh@em.agr.ca

The A B C of proteins

Dairy and Swine R&D Centre, Lennoxville

Canada

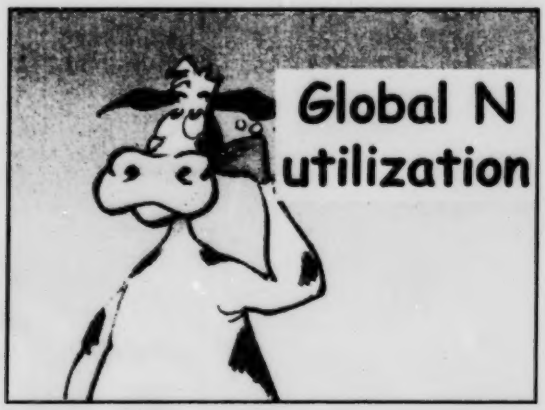
Hélène Lapierre, AAFC, Lennoxville
Robert Berthiaume, AAFC, Lennoxville
Carole Thivierge, Université Laval

Dairy and Swine R&D Centre, Lennoxville

Canada

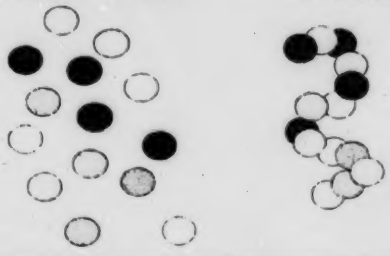
We will discuss:

- Global N utilization
- Amino acids
- Intestinal disappearance
- Portal absorption
- Liver extraction
- Mammary gland
- Practical implications



What is a protein?

Amino Acids **Protein**



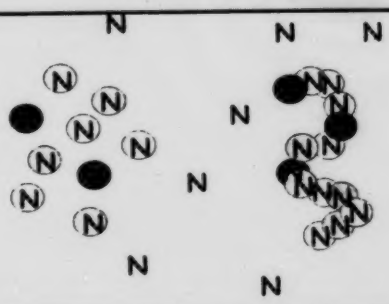
What is a protein?

Protein

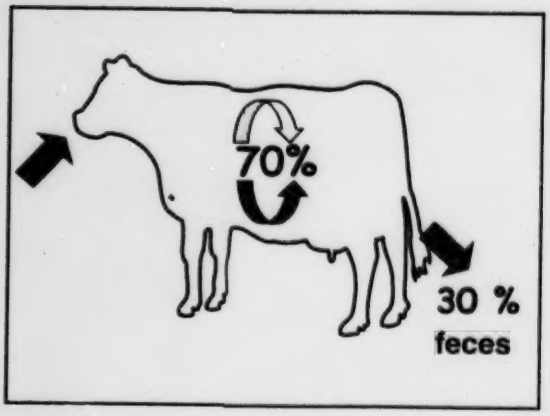
Fat

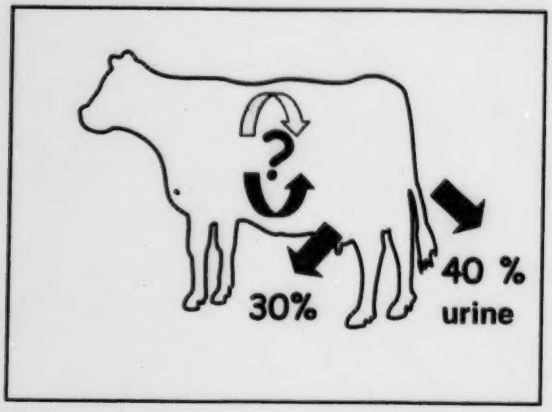
Sugar

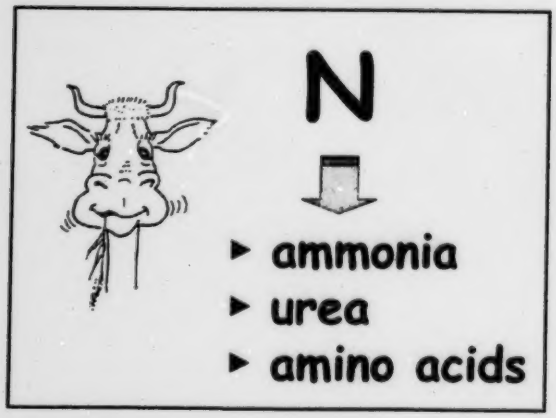
What is a protein?

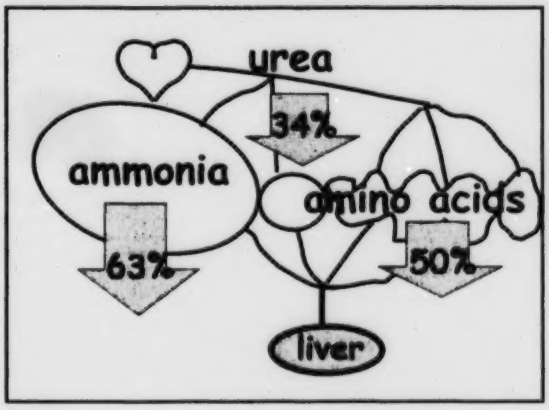


CASEIN

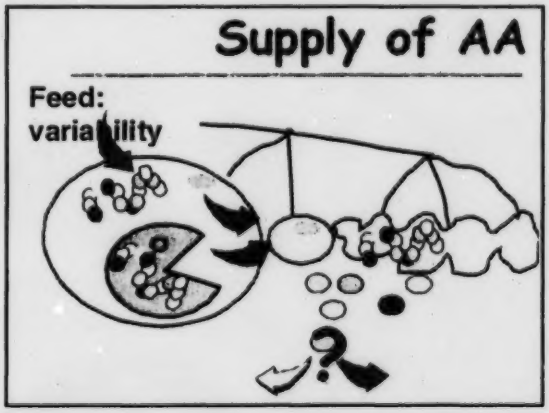

70%
30 %
feces


?
40 %
urine
30%

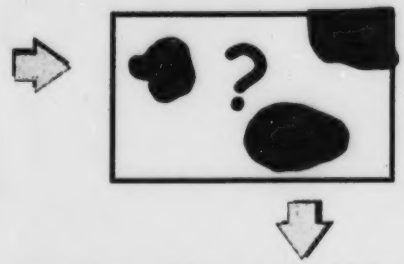

N
ammonia
urea
amino acids


urea
34%
ammonia
amino acids
63%
50%
liver

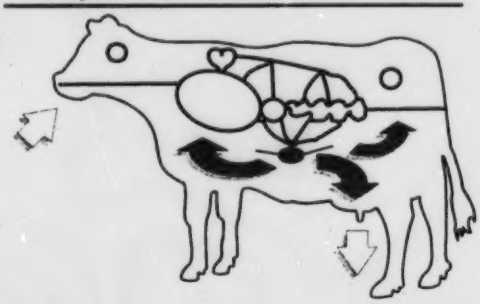
Amino
Acids


Supply of AA
Feed:
variability
?

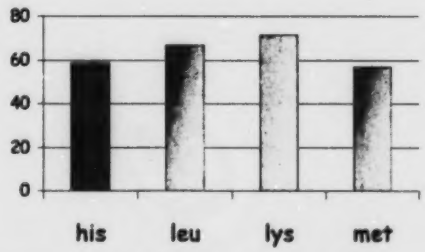
Requirements



Requirements

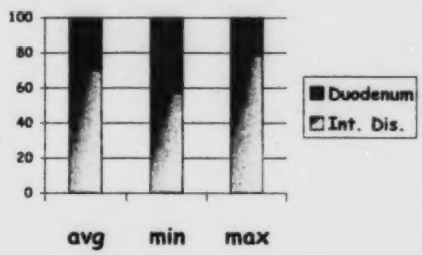


Apparent Intestinal Digestibility (%)

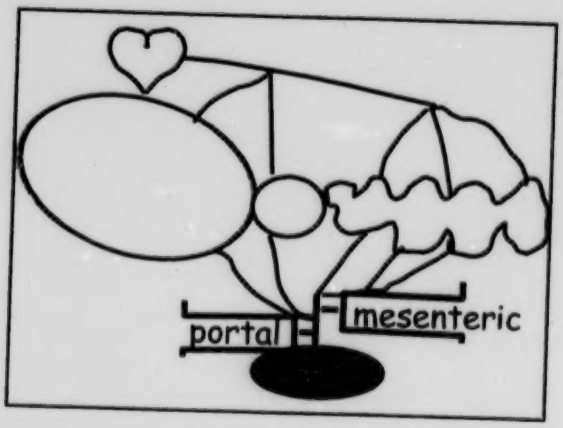


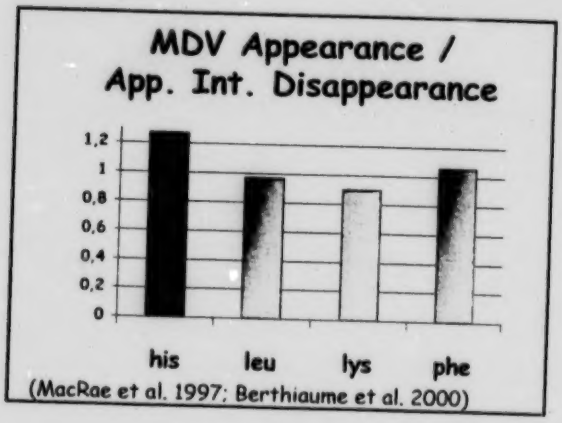
(Coomer et al. 1993; Berthiaume et al. 2000)

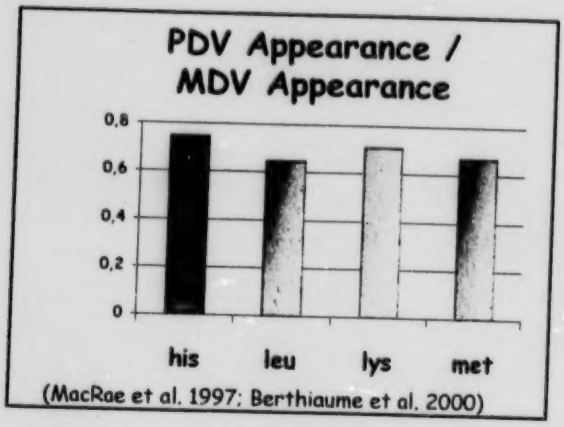
Summary: Intestinal Disappearance



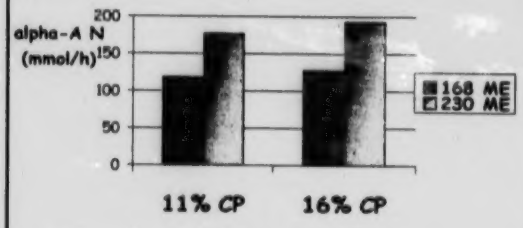
Absorption into the Blood


portal
mesenteric


MDV Appearance /
App. Int. Disappearance
1,2
1
0,8
0,6
0,4
0,2
0
his
leu
lys
phe
(MacRae et al. 1997; Berthiaume et al. 2000)

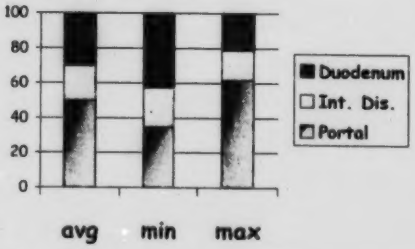

PDV Appearance /
MDV Appearance
0,8
0,6
0,4
0,2
0
his
leu
lys
met
(MacRae et al. 1997; Berthiaume et al. 2000)

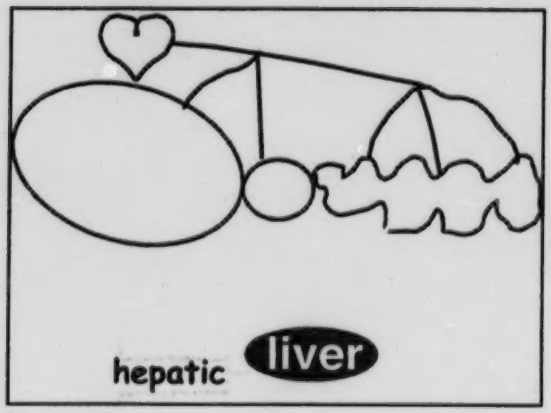
Portal AA Absorption

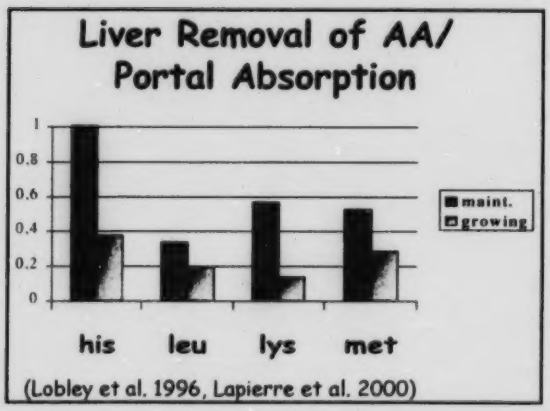


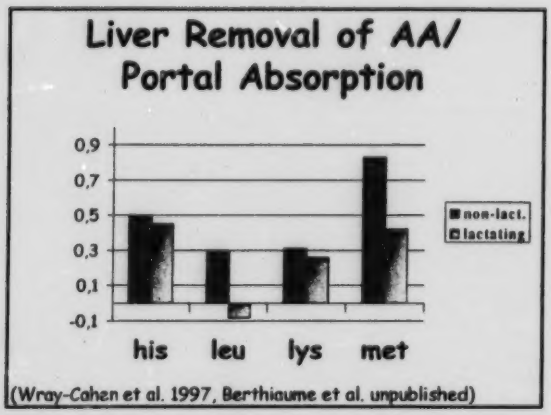
(Reynolds et al. 1991)

Summary: Portal Supply




hepatic
liver


Liver Removal of AA/
Portal Absorption
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
maint.
growing
his
leu
lys
met
(Lobley et al. 1996, Lapierre et al. 2000)

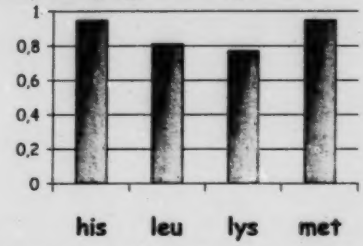

Liver Removal of AA/
Portal Absorption
0,9
0,7
0,5
0,3
0,1
-0,1
non-lact.
lactating
his
leu
lys
met
(Wray-Cahen et al. 1997, Berthiaume et al. unpublished)

Effect of Liver Removal of AA on Supply to Peripheral Tissues

(Bruckental et al. 1997)

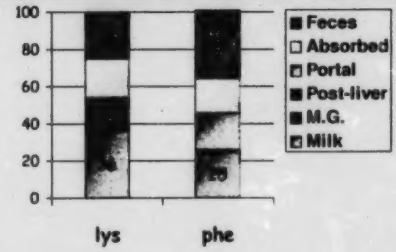
Summary: Post-liver Supply

Milk output/ mammary gland uptake



(Thivierge et al. unpublished)

Summary: Milk / duodenum supply



And now?

Limiting amino acids

CASEIN
CASEIN

+ I I

Limiting amino acids

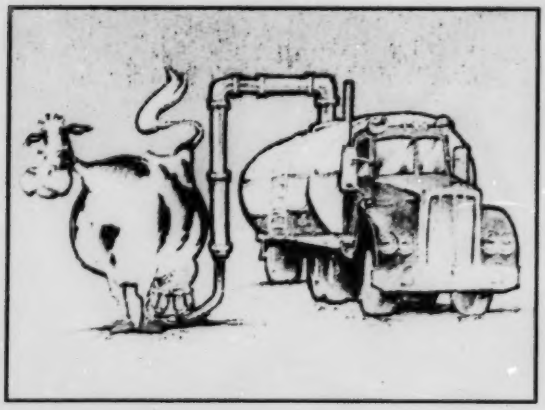
CASEIN
CASEIN
CASEIN
CASEIN

Balance:

supply = requirements

Expression of requirements

- Percentage
- Total amount
- Relation-energy



Example:

Balancing for *AA*
- 16.8 vs 17.6 % C.P.
- $0.08/cow x day

(Armentano, 2000)

How to get there?

1) Maximize microbial protein
   -> enough NDF, NSC
   -> enough RDP
2) Low rumen degradability
3) Rumen protected amino acids

Thanks

- Agriculture and Agri-Food Canada
- Degussa Hüls Canada inc.
- FPLQ
- Novalait inc.

Recent Advances in Enzymes for Ruminants

T. A. McAllister
Lethbridge Research Centre, Agriculture and Agri-Food Canada

- Supplemental enzymes can increase milk production.
- Enzymes enhance digestion through several different mechanisms.
- Greatest benefits are likely to come from high-producing cows with impaired fibre digestion.
- Effective fibre content of the diet may need to be increased in diets with added enzymes.
- Defining the mechanism of action may lead to the development of enzymes with even greater benefits in dairy production.

Enzymes are naturally occurring proteins that are produced by living cells and act as catalysts in biochemical reactions. Complete digestion of complex feeds such as hay or grain requires literally hundreds of enzymes. Enzyme preparations for ruminants are marketed primarily on the basis of their capacity to degrade plant cell walls and as such, are often referred to as cellulases or xylanases. Depending on the preparation and the animal type, supplemental enzymes have increased milk production in dairy cows and improved feed efficiency in beef cattle.

Several studies have attempted to define the mode of action of these additives in ruminant diets. Enzymes begin to digest fibre in feed shortly after they are applied. This digestion accelerates the rate of fibre digestion in the rumen and increases the number and the digestive activity of the bacteria responsible for feed digestion in the rumen. There is further evidence that many of these enzymes remain active in the rumen and complement microbial digestive activity. This appears to be especially true when fibre digestion is impaired due to low rumen pH.

Defining the "mode of action" of enzymes should enable researchers to design enzyme supplements that are feed specific and thereby further enhance the ability of these additives to improve feed utilization in dairy cattle. This presentation will discuss potential research strategies that may be employed to further increase the value of these products in dairy diets.

Biographical notes

Tim McAllister

Tim McAllister obtained his M.Sc. in Animal Biochemistry at the University of Alberta and his Ph. D. in Rumen Microbiology and Nutrition from the University of Guelph in1991. He then obtained a NSERC (Natural Sciences and Engineering Research Council) postdoctoral fellowship with the University of Calgary where he continued to conduct studies on the relationships between microbial biofilm development and feed digestion. He joined the Lethbridge Research Centre of Agriculture and Agri-Food Canada in 1993. After appointments in technical and biologist positions, he was promoted to Research Scientist. He is presently in charge of a diverse research team studying grain processing, enzymes for ruminants, rumen ecology, feeding management, and genetic engineering. Tim has authored over 100 scientific papers and is a recipient of the Pfizer Young Scientist Award and the Canadian Animal Industries Award in Extension and Public Service for his contributions to beef production in Canada.

Tim McAllister
Agriculture and Agri-Food Canada
Research Station
P.O. Box 3000 Main
Lethbridge AB T1J 4B1

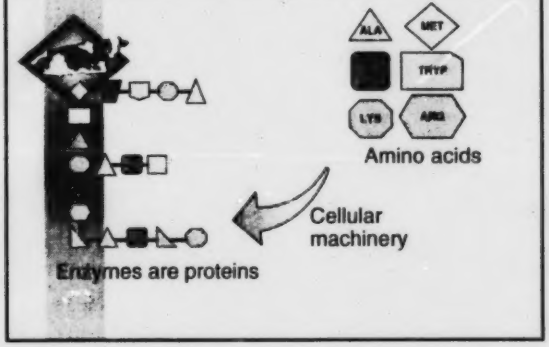
Phone: 403-317-2240
Fax: 403-382-3156
Email: mcallister@em.agr.ca

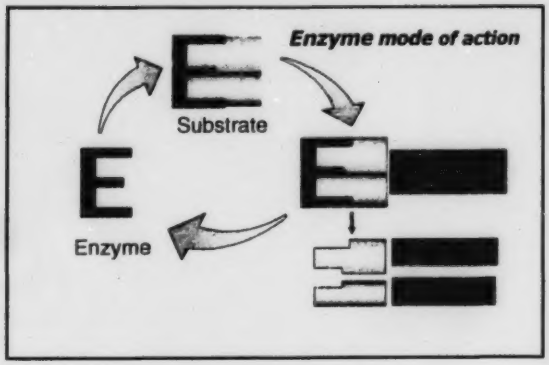
Recent advances in enzymes for ruminants

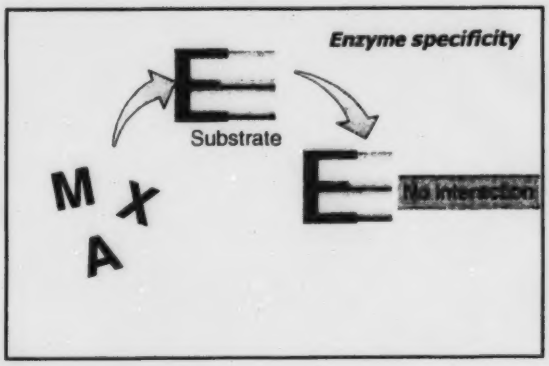
T. A. McAllister, Karen Beauchemin, Lyle Rode, A. Hristov and Y. Wang

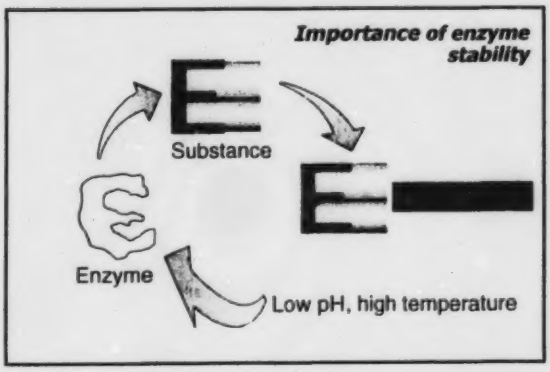
Topics

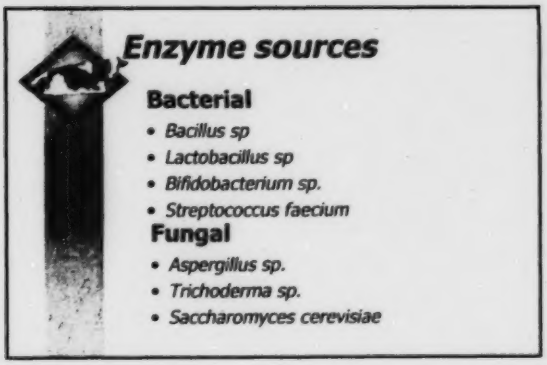
- What is an enzyme?
- Mode of action
- Performance responses
- Future directions

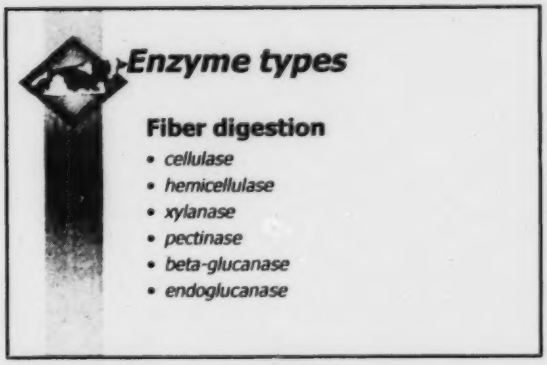


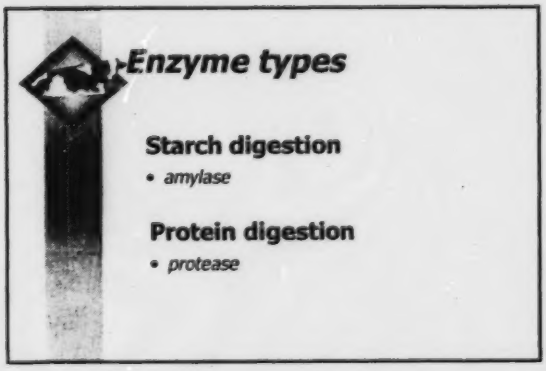

Enzyme mode of action
Substrate
Enzyme


Enzyme specificity
Substrate
No interaction


Importance of enzyme stability
Substance
Enzyme
Low pH, high temperature


Enzyme sources
Bacterial
• Bacillus sp
• Lactobacillus sp
• Bifidobacterium sp.
• Streptococcus faecium
Fungal
• Aspergillus sp.
• Trichoderma sp.
• Saccharomyces cerevisiae


Enzyme types
Fiber digestion
• cellulase
• hemicellulase
• xylanase
• pectinase
• beta-glucanase
• endoglucanase


Enzyme types
Starch digestion
• amylase
Protein digestion
• protease

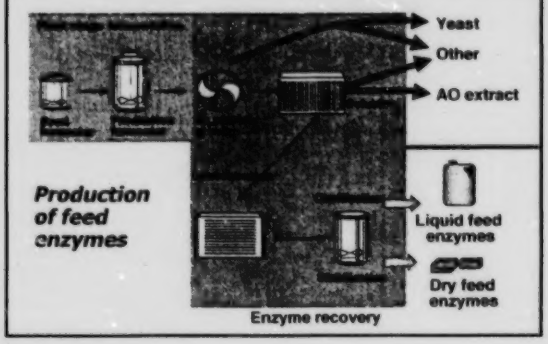
Enzyme activity

Units

- product released per unit time

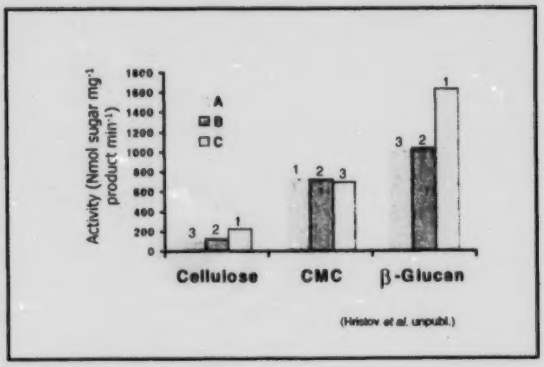
Assay conditions are not standardized

- pH, buffers, temperature
- substrate type

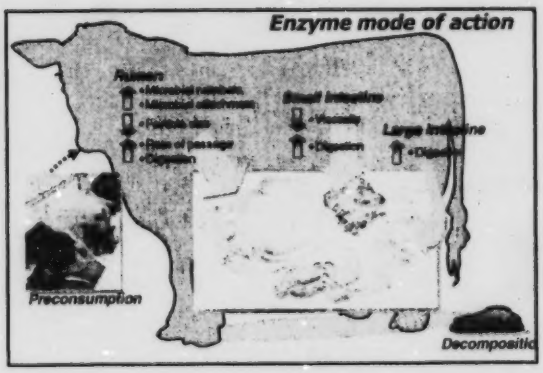


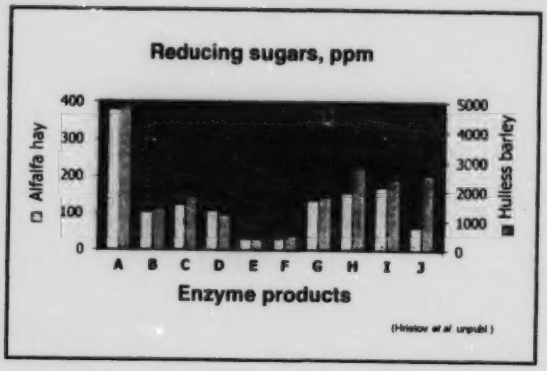
Relative polysaccharidase activity of 4 feed enzymes with cellulase activity

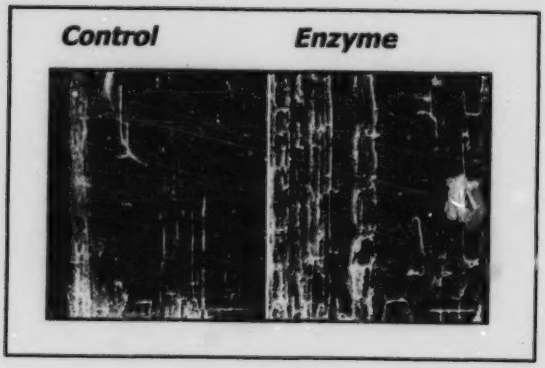
Item	A	B	C	D
Cellulase	100	100	100	100
α-amylase	85.1	7.37	66.0	ND
β-glucanase	357	503	369	101
Cellulase	55.9	67.2	56.1	39.2
Cellulose 1, 4-β-cellobiosidase	43.9	57.4	22.8	19.5
Endo-1, 4-β-xylanase	153	90.5	138	130
Licheninase	139	260	134	38.8
Endo-1, 3 (4)-β-glucanase	39.6	116	78.6	20.8

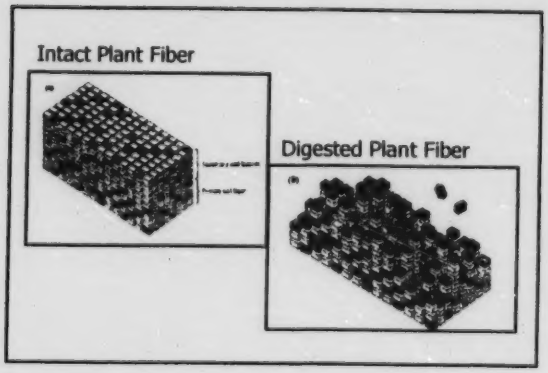


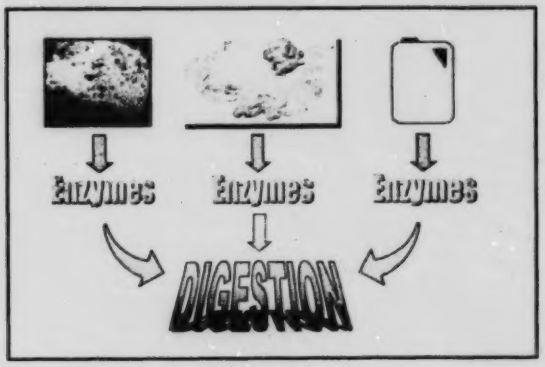
Modes of enzyme action in cattle diets



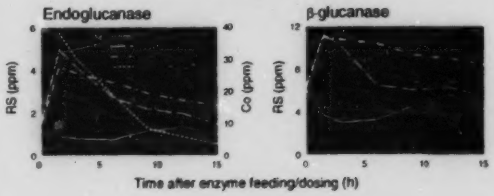

Reducing sugars, ppm
Alfalfa hay
Hulless barley
400
300
200
100
0
5000
4000
3000
2000
1000
0
A B C D E F G H I J
Enzyme products
(Hristov et al. unpubl.)


Control
Enzyme


Intact Plant Fiber
Digested Plant Fiber

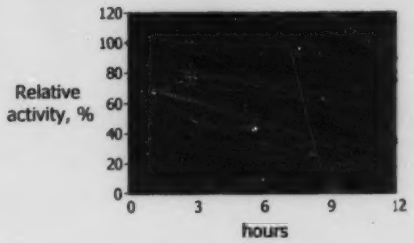


Effect of exogenous enzymes on total ruminal activity

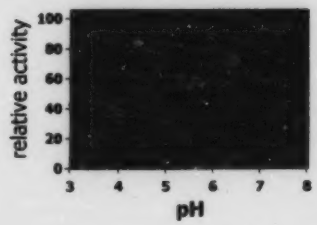


(Hristov *et al.* 1999)

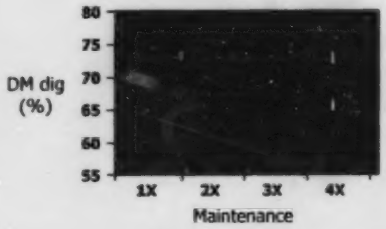
Stability of 4 feed enzymes in rumen fluid



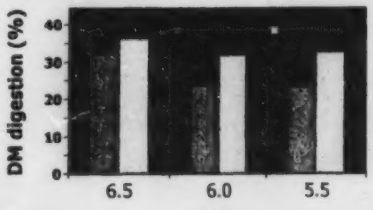
Effect of pH on relative xylanase activity in feed enzymes vs ruminal enzymes



Expected depression in digestibility (NRC)

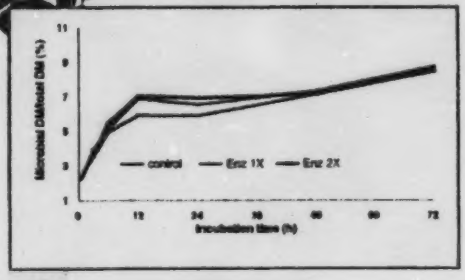


Effect of a feed enzyme product on corn silage digestibility at different pH



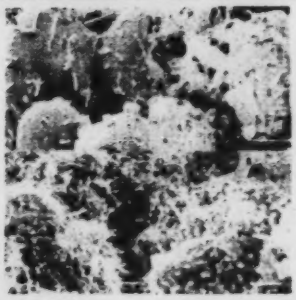
(Morgavi *et al.* In press)

Feed enzymes increase microbial ization of feed particles in the rumen



Increased microbial numbers

Control

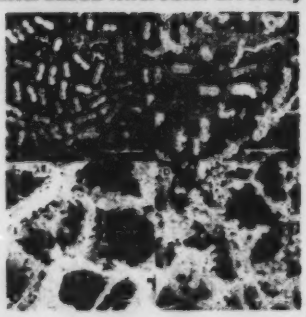


Enzyme

(Wang et al. 2000)

Increased microbial diversity

Control



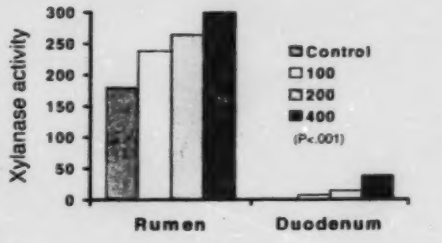
Enzyme

(Wang et al. 2000)

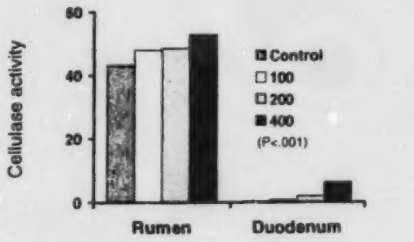
Digestibility of starch and NDF in lactating cows fed barley with enzyme supplements

	Diet	
	Barley	Barley & enzymes
Starch Digestability		
Ruminal	64.9	65.0
Entering intestine	46.4	67.5
Total tract	82.7	89.2
NDF Digestability		
Ruminal	57.4	55.8
Entering intestine	4.5	11.9
Total Tract	58.8	61.7

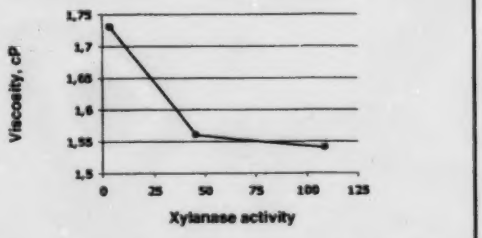
(Beauchemin *et al.* 1999)



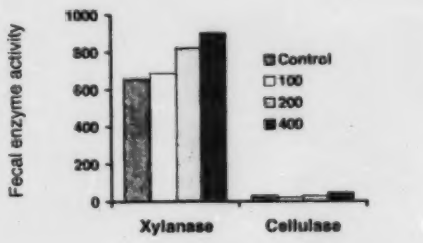
(Hristov *et al.* 2000)



(Hristov *et al.* 2000)

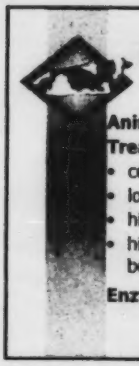


(Hristov et al. 2000)



(Hristov et al. 2000)

Production responses to enzymes



Responses in dairy diets

Animals: cannulated lactating cows

Treatments:

- control (45% cubes)
- low enzyme, added to cubes (L-cubes, 0.5 g kg^{-1})
- high enzyme, added to cubes (H-cubes, 1.0 g kg^{-1})
- high enzyme, added to cubes and concentrate (H-both)

Enzyme: Pro-Mote (Biovance Technol.)

Intake and digestibility

	Control	L-cubes	H-cubes	H-both
Dry matter intake, kg/d	20.4	20.7	20.7	20.8
Total tract digestibility, %				
organic matter	64.4^{b}	65.9^{ab}	67.0^{a}	66.5^{a}
neutral detergent fiber	38.8^{b}	41.2^{ab}	43.6^{a}	42.4^{ab}

$^{a,b}P < 0.05$

L = low level of enzyme in the diet
H = high level of enzyme in the diet
Yang et al. 1999

Ruminal digestibility (%)

	Control	L-cubes	H-cubes	H-both
Organic matter	54.1	54.3	58.4	57.2
Starch	77.9	74.5	81.2	82.3
NDF	30.7	34.9	36.9	35.6

L = low level of enzyme in the diet
H = high level of enzyme in the diet
Yang et al. 1999

Duodenal protein flow (kg/d)

	Control	L-cubes	H-cubes	H-both
Microbial	1.81^{ab}	1.71^{b}	2.10^{a}	2.03^{ab}
Feed (bypass)	2.05^{a}	1.96^{ab}	1.60^{b}	1.63^{b}
Total	3.86	3.67	3.70	3.63

$^{a,b}P < 0.10$
Yang et al. 1999

Milk production and composition

	Control	L-cubes	H-cubes	H-both
Milk yield, kg/d	23.7^{b}	24.6^{ab}	25.6^{a}	25.3^{ab}
Milk composition, %				
Fat	3.79	3.70	3.78	3.76
Protein	3.36	3.41	3.48	3.49

$^{a,b}P < 0.05$
L = low level of enzyme in the diet
H = high level of enzyme in the diet
Yang et al. 1999

Study 2: Effects of supplementing diets with feed enzymes (1.3 g kg^{-1},wk 0 -12, 10 cows/trt)

	Control	Enzyme
Dry matter intake, kg/d	18.7	19.0
NDF digestion, %	42.5 ^{b}	51.0 ^{a}
Milk yield, kg/d	35.9 ^{e}	39.5 ^{f}
Milk fat, %	3.87 ^{a}	3.37 ^{b}
Milk protein, %	3.24	3.03

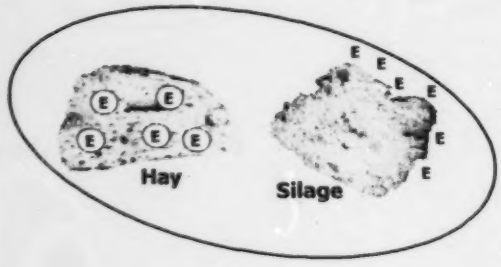
$^{a,b}P < 0.05$ $^{e,f}P = 0.11$ Rode et al. 1999. JDS 82:2121

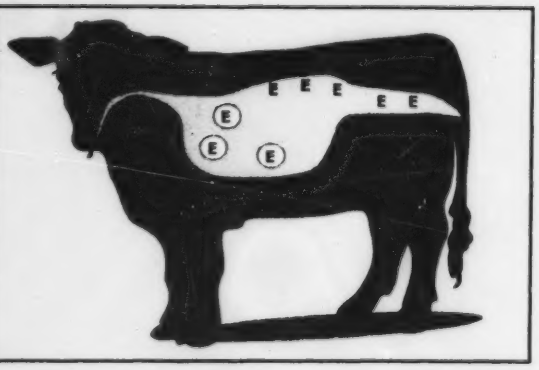
Study 3: Effects of supplementing diets with feed enzymes *(1.5 g kg^{-1},wk 3-15, 15 cows/trt)*

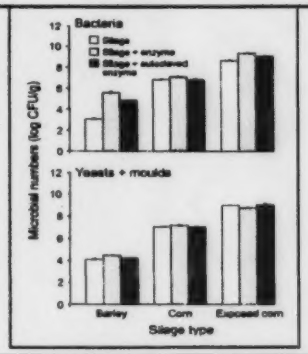
	Control	Enzyme TMR	Enzyme Conc
Dry matter intake, kg/d	19.4	20.4	19.8
NDF digestion, %	42.6	45.9	44.3
Milk yield, kg/d	35.3 ^{b}	35.2 ^{b}	37.4 ^{a}
Milk fat, %	3.34	3.14	3.19
Milk protein, %	3.18	3.13	3.13

^{a,b} $P < 0.05$

Yang et al. 2000. submitted to JDS



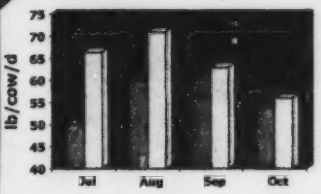




Commercial field trial
(McArthur Farms Inc.)

- 1,371 control, 627 enzyme cows
- Enzyme was Promote NET (Agribrands Int., St. Louis, MO)
- June 5 - Aug 25, 1999
- Florida - during heat stress
- projected milk yield (lb)
  - Control: 21,672 (Jun 2), 21,605 (Jly 3)
  - Enzyme: 18,049 (Jun 2), 20,141 (Jly 3)

Milk production of cows in early lactation



Diet was not reformulated for the enzyme

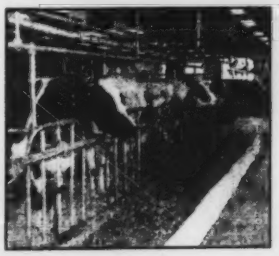
Commercial field trial: all cows

ADG of feedlot cattle with and without enzymes

	Diet		
	CON	ENZ	ENZ x 2
Backgrounding	1.16	1.69	1.71
Finishing	1.62	1.63	1.58

(McAllister et al. 2000)

High producing dairy cows



- 8% increase in milk production in mid-lactation cows
- cows negative energy balance
- will respond to increased digestibility of diet

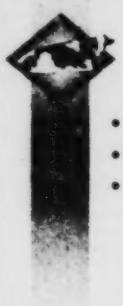
Strategies for further enhancing enzymes

New enzyme sources

- Novel microorganisms
- Novel environments

Product consistency

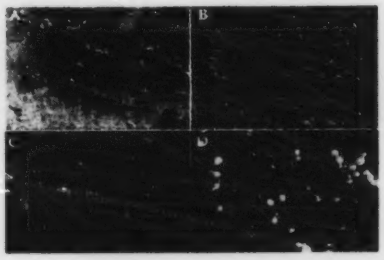
- Fermentation substrates
- Surfactants
- Preservatives



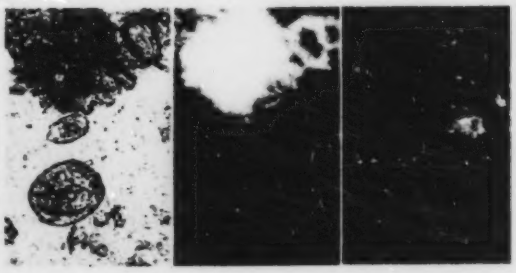
Enzyme protection

- Reduce microbial degradation
- Resist degradation in abomasum
- Deliver active enzyme to small intestine

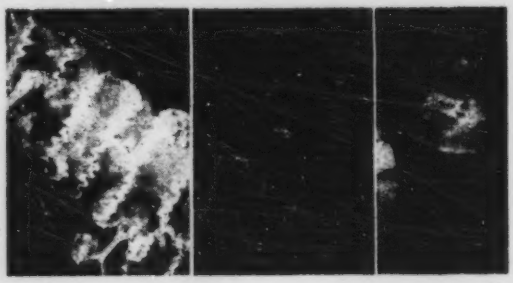
Pichia expression



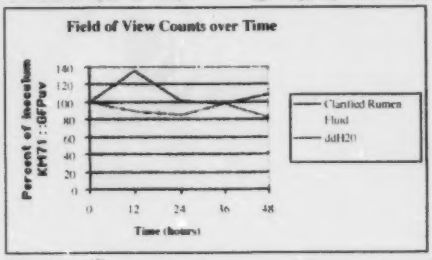
Epifluorescence microscopy



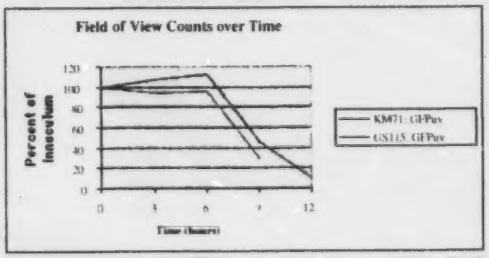
Epifluorescence microscopy



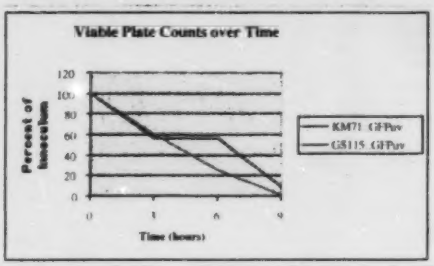
Survival in clarified rumen fluid



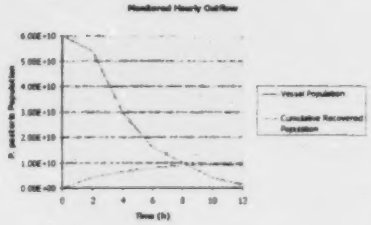
Survival in bacterial fraction



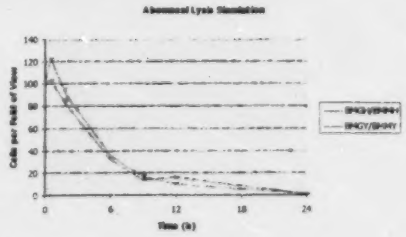
Survival in bacterial fraction



Survival in RUSITEC



Survival in gastric juice

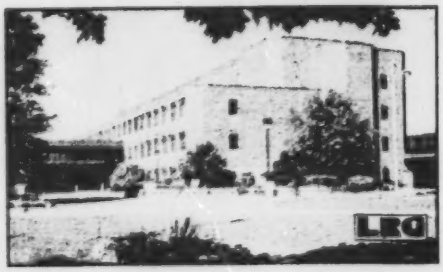


Method of application

- Importance of even distribution
- Dry feed vs silage
- Enzyme substrate interaction

Improving the consistency of positive responses to enzymes

- Use the right enzyme
- Apply it at the appropriate rate
- Apply it in appropriate manner
- *mode of action*



Cow Comfort and Barn Design

Daniel M. Weary[1], Jeffrey Rushen[2] and Anne Marie de Passillé[2]
[1]*Animal Welfare Program, Faculty of Agricultural Sciences, University of British Columbia*
[2]*Dairy and Swine Research and Development Centre, Agriculture and Agri-Food Canada*

- Ensuring cow comfort is essential to maintain health and productivity.
- Improving stall design will increase rest, increase stall usage, reduce leg and foot problems and ultimately improve production.
- Research helps us to desigh better stalls, flooring and feeders so as to improve cow comfort.

The issue of cow comfort is becoming increasingly important for dairy farmers, and research is now showing that inadequate stall and barn design can result in reduced stall occupancy, leg and foot problems, and potentially lower production. Although producers realize that providing cows with better facilities will help address these problems, there has been almost no research to support practical recommendations on issues such as stall design.

In this presentation we review a number of features of stall design and how these affect cow comfort. For example, geotextile mattresses are promoted as a comfortable surface for free-stalls, but recent work has shown that the use of these mattresses is associated with leg injuries on cows. Lesions were most prevalent (91% of cows) on farms using geotextile mattresses in the stalls, and least common (24% of cows) on farms using sand as stall bedding. In another study we followed cows, initially without lesions, after they were moved into a free-stall barn. These cows developed lesions within a few weeks of being moved off pasture, and lesions developed more rapidly when cows were housed in stalls with mattresses than with deep-bedded sand. In another experiment, we found that keeping more bedding on mattresses could reduce lesions.

Although our experiments have shown that inadequately bedded mattresses are associated with more leg injuries than deep-bedded free stalls, mattresses have been shown to provide real advantages over some other options. For example, recent work has found that the front knees of cows are less likely to be swollen when cows are kept in tie stalls with mattresses, than when kept in stalls with cement floors. Stall bedding can also affect how long cows spend lying down; cows provided with mattresses in their tie-stalls spend 1.5 h/day more time lying down than do cows provided with only cement to lie on.

In another experiment, cows were provided with either a conventional tie stall with cement floors and only small amount of straw bedding, or with a spacious, well-bedded pen with a geotextile mattress. Cows in the larger and presumably more comfortable pens spent more time lying down and less time standing inactive. We have now begun work looking at stall dimensions such as stall width and neck-rail placement and found that these dimensions can affect how much cows use stalls, as well as stall cleanliness.

Cow comfort is affected not just by what cows lie in (stall design), but also what they stand upon and how long they need to spend standing. Flooring and time spent standing are thought to affect hoof health, but research on the effects of alternative flooring and management practices that help reduce standing times is only just beginning.

Biographical notes

Dan Weary

Dan Weary holds an NSERC Industrial Research Chair in Animal Welfare, and is an Associate Professor in the Faculty of Agricultural Sciences. He came to UBC in the fall of 1997, after working as a Research Scientist with Agriculture and Agri-Food Canada in Ottawa. Dan did a B.Sc. and an M.Sc. in Biology at McGill University, a D. Phil. at Oxford University in the Department of Zoology, and worked as a post-doctoral fellow at McGill, Queen's and Concordia Universities.

Dan Weary's work with UBC's Animal Welfare Program focuses especially on dairy cattle, and he is currently working on improving housing and management for both the lactating cow and the young calf.

Dan Weary
Animal Welfare Program
Faculty of Agricultural Sciences
2357 Main Mall
Vancouver, BC V6T 1Z4

Phone.:(604) 822-3954
Fax: (604) 822-4400
Email: danweary@onixq.ubc.ca

Cow comfort and stall design

Daniel M. Weary
Animal Welfare Program
University of British Colombia

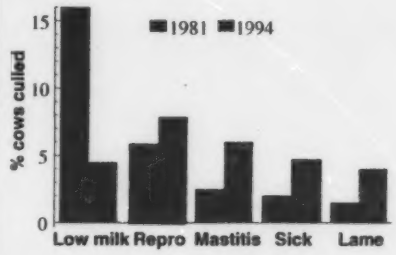
Jeff Rushen and Anne Marie de Passillé
Dairy and Swine R&D Centre, Lennoxville
Agriculture and Agri-Food Canada

UBC's Animal Welfare Program

Cow comfort and stall design

Designing environments to reduce stress and improve welfare, health, longevity and productivity

Health problems are major causes of culling - facilites must be designed to reduce stress

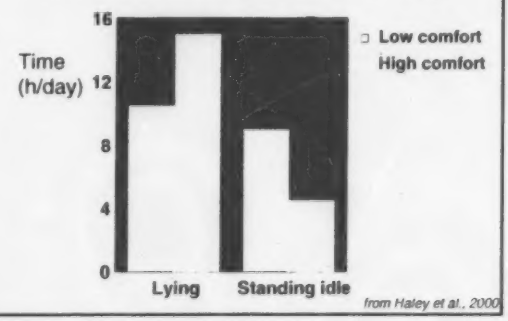


Dürr et al 1997 Can J Anim Sci 77 601-608

The importance of rest and sleep

Increase	growth hormone heifer growth rumination time blood flow to udder
Decrease	wear on hoofs and legs

Large, comfortable pen = 4 more hours of rest each day

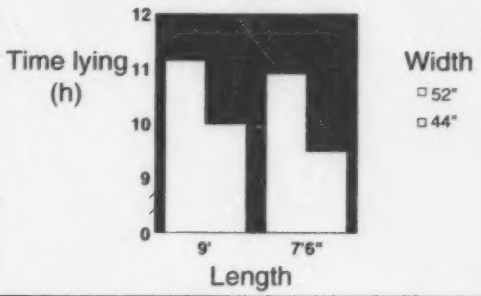


from Haley et al., 2000

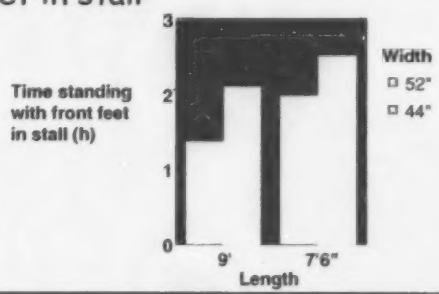
Stall size - industry recommendations

Feature	*Low*	*High*
Stall		
length	7'6"	9'
width	41"	52"
Neck rail		
height	37"	50"
distance from curb	60"	77"
Brisket board		
height	8"	12"
distance from curb	60"	77"

Wider stalls increase resting time



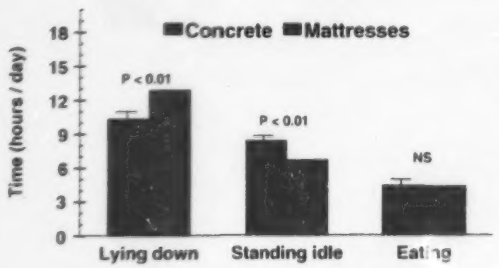
Wider, longer stalls = less time standing with front feet in stall



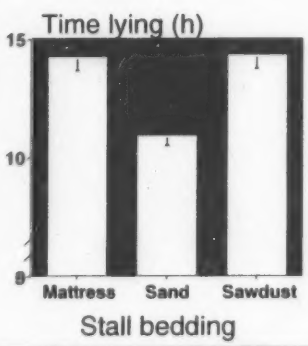
Cow comfort and free-stall design -stall length and width

- Increased lying times in wider stalls
- "2-feet standing" reduced in wider and longer stalls
- no difference in stall cleanliness

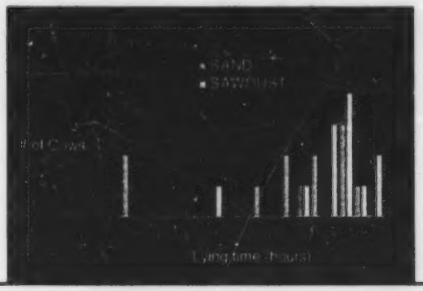
Cows on geotextile mattresses spent 2.5 h more lying down



Cows spend less time lying down on sand

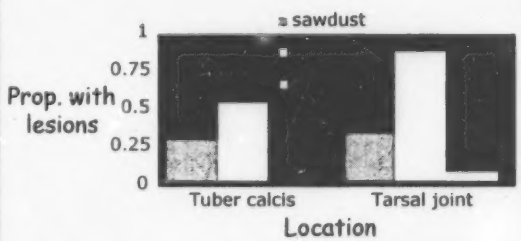


Cows differ in their responses to bedding



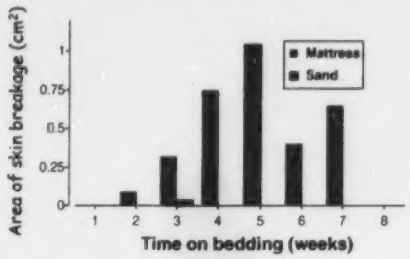
Hock injuries

Lesions most common and most severe on mattresses



from Taszkun & Weary, 2000

Lesions develop rapidly when moved to free stalls from pasture

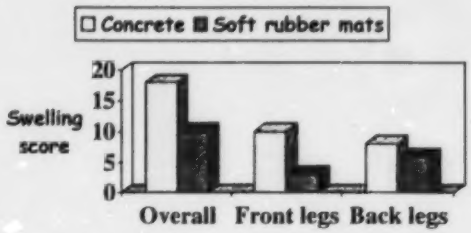


Hock injuries

- Cross-farm comparisons
- Lesion development
- Preventing lesions
  - Adding 325 mesh limestone flour to bedding has no effect on lesions
  - Increasing the amount of bedding used reduces incidence and severity of lesions

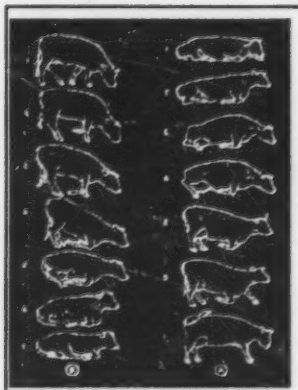
Knee swelling

Cows on soft rubber mats have fewer swollen knees



Stall bedding

- Less swollen knees on mattresses than concrete
- more hock lesions on mattresses than sand, especially if poorly bedded
- sand bedding associated with reduced hock injury but reduced lying times?
- individual variation in response
- new work on udder health



Biomechanics: How cows stand up and lie down

Other areas of cow comfort needing research

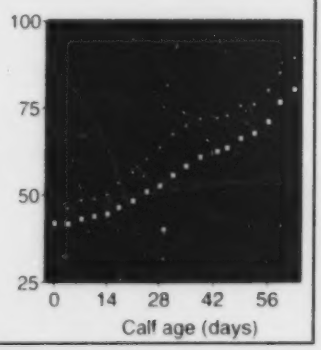
- Walking surfaces - lameness and laminitis (DFC)
- feeder design
- stocking rate

UBC Animal Welfare Program

Other dairy research -

- Calf rearing
  - dehorning
  - age of separation
  - ad-lib feeding of milk
  - group housing
  - weaning

Feeding calves more milk dramatically improves weight gains



Thanks!

Researchers: Dr. Mike Appleby, Dr. Steve Appleyard, Dr. Marek Gaworski, Dr. Jeremy Marchant, Dr. Job Matias, Dr. Iwona Taszkun,Erin Bell, Art Ceballos, Paul Faulkner, Frances Flower, Ruth Forrie, Jennifer Jasper, Fritha Langford, Cassandra Tucker, Tamiko Thomas, Bev Chua, Eveline Coenen, Arend Hoekstra, Dominique Falconer, Sylvia Huang, Paul Jong, Melanie Lantz, Laura Mowbray, Jessica Paterson, Joyce van Delen, Fay Wan, Amanda Zimmerman

Funders: NSERC, BC SPCA, BC VMA, *DFC*, BCIDF, BC Dairy Foundation, etc.

Agriculture and Agri-Food Canada

Agriculture et Agroalimentaire Canada

La 3e Rencontre de La Voie Lactée

LA SCIENCE AU SERVICE DE L'INDUSTRIE

Canada

Les Rencontres de la Voie lactée veulent offrir une vitrine à la recherche canadienne en production laitière. Il s'agit d'une initiative des chercheurs et chercheuses en production laitière du Centre de recherche et de développement sur le bovin laitier et le porc d'Agriculture et Agroalimentaire Canada à Lennoxville, Québec. Cet événement est rendu possible grâce à la précieuse collaboration des Producteurs laitiers du Canada.

Dairy Farmers of Canada

Les Producteurs laitiers du Canada

Canada

Développer un vaccin à l'ADN contre la diarrhée virale bovine (BVD)

Brian G.Talbot
Département de Biologie, Université de Sherbrooke

- Le BVD est une maladie répandue et coûteuse contre laquelle les vaccins classiques sont peu efficaces ;
- Un vaccin à l'ADN constitue une façon sécuritaire et peu coûteuse de prévenir cette maladie.

De tous les pathogènes bovins, le virus causant le BVD est l'un des plus persistants et des plus répandus. Ce virus existe sous plusieurs formes, causant une variété de maladies allant d'une diarrhée légère à l'hémorragie aiguë. Les vaccins classiques disponibles ne protègent pas nécessairement contre les nouvelles formes de ce virus. Ainsi, en 1993, une nouvelle souche du virus a tué près de 25% des veaux au Québec.

Une nouvelle technologie, la vaccination à l'ADN, permet de déjouer des pathogènes contre lesquelles les techniques de vaccination classiques ont échoué. De plus, ces vaccins sont simples et bon marché à produire, faciles à modifier et très stables. L'objectif de cette recherche était de déterminer si un tel vaccin peut être développé afin de prévenir le BVD.

Voici comment un vaccin à l'ADN fonctionne. Un vaccin antiviral à l'ADN consiste en un brin d'ADN circulaire (plasmide), dérivé d'une bactérie inoffensive, dans lequel on insère un fragment de l'ADN du virus. Quand ce plasmide est injecté dans la peau ou le muscle du veau, l'ADN pénètre dans les cellules où il est traduit en protéines virales. Une faible quantité de protéine du virus est donc présente dans l'organisme. Bien qu'inoffensives, ces protéines sont reconnues comme étrangères et provoquent une réponse immunitaire. Tout comme lors d'une véritable infection, le veau produit des anticorps et des cellules tueuses. Cette réponse prend plusieurs semaines à s'établir. Cependant, lorsque l'animal entrera en contact avec le vrai virus, des cellules « mémoires » permettront de reconnaître rapidement l'envahisseur. Une réponse immunitaire rapide permettra alors d'éliminer le virus avant qu'il n'affecte l'animal.

Une protéine du virus du BVD, appelée E2, permet de générer une réponse immunitaire forte et protectrice. Nous avons inséré le gène de cette protéine dans un plasmide. Nous avons d'abord vérifié si la protéine E2 pouvait être produite par les bovins en transférant le plasmide dans des cellules bovines en culture. Nous avons ensuite injecté le plasmide à des souris. On a mesuré chez ces souris une réponse immunitaire (anticorps) plus forte que celle obtenue chez des souris injectées avec un vaccin anti-BVD déjà sur le marché. Le vaccin a alors été testé chez des veaux de 7 mois. Le vaccin fut injecté seul (ADN-S) ou dans une structure lipidique appelée liposome (ADN-L). Le liposome doit aider le plasmide à pénétrer dans la cellule. La production d'anticorps chez les veaux vaccinés avec l'ADN-L a été plus forte que chez les animaux vaccinés avec l'ADN seul. Cependant, la réponse en cellules tueuses a été plus forte chez les animaux vaccinés avec l'ADN seul. Lorsque les animaux ont été mis en contact avec le virus, les trois veaux vaccinés avec l'ADN-S n'ont développé aucun ou de faibles signes d'infection. Par contre, les veaux témoins ou vaccinés avec l'ADN-L ont montré les signes typiques d'une infection au BVD. Nous avons répété cette expérience en immunisant des veaux de 4 semaines avec l'ADN seul. Les animaux ont

reçu deux injections d'ADN suivies, quelques semaines plus tard, d'une injection de vaccin commercial (virus inactivé). Cinq des 8 veaux furent complètement protégés et les trois autres n'ont eu que de faibles signes cliniques lorsqu'ils ont été mis en contact avec le virus. Cependant, tous les animaux témoins ont été malades.

Nous travaillons présentement à augmenter l'efficacité et le spectre du vaccin en ajoutant des gènes provenant d'autres souches de BVD et/ou présents dans toutes les souches de ce virus.

Notes biographiques

Brian Talbot

Brian Talbot est professeur au Département de biologie, Université de Sherbrooke. Il s'intéresse à l'établissement d'immuno-essais à l'aide d'anticorps monoclonaux et à l'étude de nouvelles technologies de vaccination contre les virus et les bactéries. Il a obtenu son B.Sc. (Hons) en Biochimie appliquée à l'Université de Bath, Angleterre, et son Doctorat en chimie (Biochimie) à l'Université de Calgary, Alberta. Il a fait des stages post-doctoraux à l'Université de Guelph en Sciences de l'environnement et à l'Université de Sherbrooke en Microbiologie et génétique. Entre 1984 et 1986, il était directeur du Laboratoire des anticorps monoclonaux à l'Université de Sherbrooke. Depuis 1997, M. Talbot est aussi professeur adjoint au Département de pathologie et microbiologie de la Faculté de Médecine Vétérinaire de l'Université de Montréal.

Brian Talbot
Département de biologie
Faculté des sciences
Université de Sherbrooke
2500, boul. de l'Université
Sherbrooke, QC J1K 2R1

Téléphone : (819) 821-8000 poste 2065
Télécopieur : (819) 821-8049
Courriel: btalbot@courrier.usherb.ca

Un vaccin à l'ADN contre la diarrhée virale bovine (BVDV)

Dr. Brian G. Talbot, Ph.D.
Université de Sherbrooke

Le problème des vaccins...

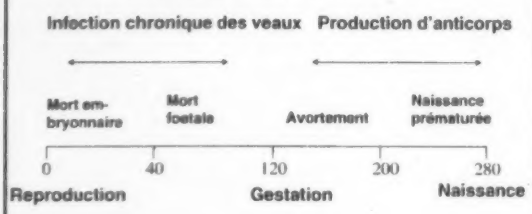
Quand ça marche,

on ne voit rien...

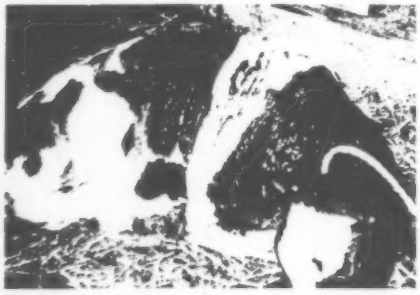
La maladie du BVDV

- Symptômes
  - **forte fièvre**
  - **moins de plaquettes sanguines**
  - **diarrhée**
  - **hémorrhagie**
  - **mort**
- Pertes économiques
  - **plusieurs millions $**
  - **mortalité: 5 % en 1991, 35 % en 1993**

Les effets du BVDV varient selon le temps d'infection et la virulence du virus



Dans le pire des cas...

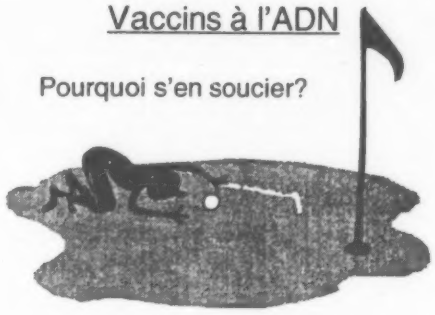


Vaccination et BVDV

- +100 vaccins commerciaux sur le marché américain
- efficacité variable et ne protègent pas contre les nouvelles souches
- vaccins recombinant ou vaccins sous-unités: TROP CHERS!!

Vaccins à l'ADN

Pourquoi s'en soucier?



Les vaccins à l'ADN
Été 2000

6 sept La marine américaine commence des essais cliniques sur un vaccin à l'ADN contre la **malaria**

5 sept L'Angleterre commence les essais d'un vaccin contre le **SIDA** sur les humains

24 août De nouveaux tests d'un vaccin contre les **allergies** à partir d'ADN bactérien

16 août EpiVax et Brown University annoncent un projet de vaccin contre le **SIDA**

9 août Un vaccin à l'ADN contre l'**arthrite** et la **sclérose en plaques** chez les animaux de laboratoire

Vaccin à l'ADN vs classique

Propriété	**Type de vaccin**	
	Pathogène atténué	Vaccin à l'ADN
Stabilité	-	+
Coût de prod.	+ / -	-
Coût de dév.	-	+
Sûreté	-	+
Vaccination néonatale	-	+
Combinaison de maladies	-	+

Comment ça marche?

1. Cloner le gène de la protéine

Comment ça marche?

2. Vecteur d'expression du plasmide

1. Cloner le gène de la protéine

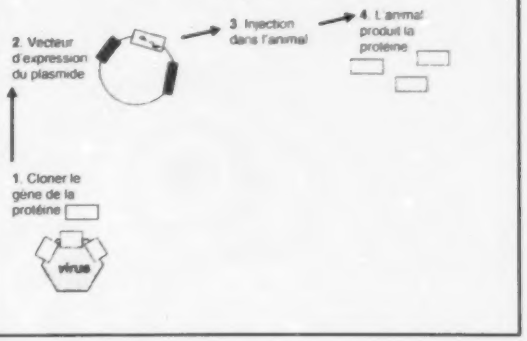
Comment ça marche?

2. Vecteur d'expression du plasmide

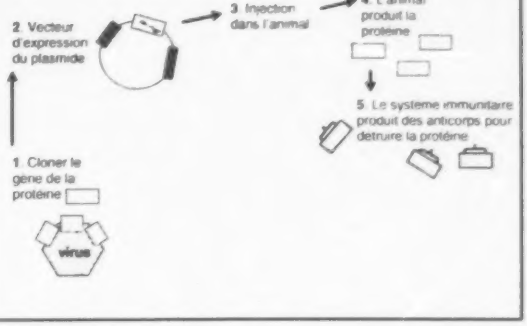
3. Injection dans l'animal

1. Cloner le gène de la protéine

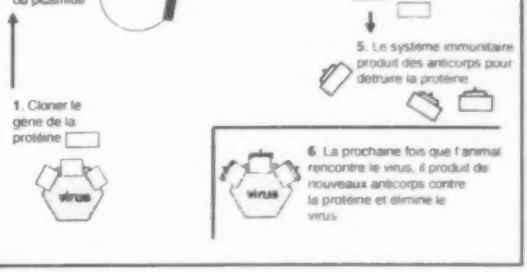
Comment ça marche?


2. Vecteur d'expression du plasmide
3. Injection dans l'animal
4. L'animal produit la protéine
1. Cloner le gène de la protéine
virus

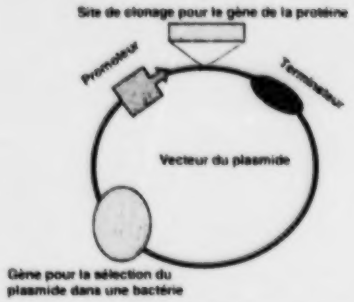
Comment ça marche?


2. Vecteur d'expression du plasmide
3. Injection dans l'animal
4. L'animal produit la protéine
5. Le système immunitaire produit des anticorps pour détruire la protéine
1. Cloner le gène de la protéine
virus

Comment ça marche?


2. Vecteur d'expression du plasmide
3. Injection dans l'animal
4. L'animal produit la protéine
5. Le système immunitaire produit des anticorps pour détruire la protéine
1. Cloner le gène de la protéine
virus
6. La prochaine fois que l'animal rencontre le virus, il produit de nouveaux anticorps contre la protéine et élimine le virus

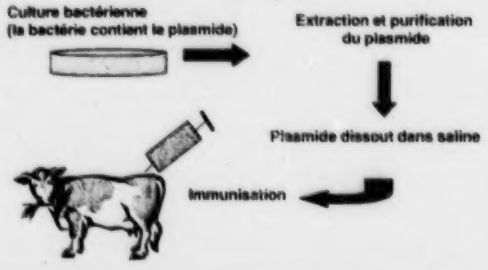
Vecteur d'expression du vaccin à l'ADN


Site de clonage pour le gène de la protéine
Promoteur
Terminateur
Vecteur du plasmide
Gène pour la sélection du plasmide dans une bactérie

Objectif: un vaccin à l'ADN pour protéger les veaux contre le BVDV

- Identifier le meilleur gène
- construire le plasmide approprié
- le vérifier en culture
- vacciner des souris (livraison)
- vérifier la production d'anticorps neutralisants contre le BVDV
- répéter chez le bovin
- améliorer l'efficacité chez le bovin

Production et utilisation d'un vaccin à l'ADN



Deux types de réponse immunitaire

- Production d'anticorps pour retirer les microbes du sang et des tissus extra-cellulaires.
- Production de cellules cytotoxiques (CTL) pour tuer les cellules infectées de l'animal.

Comment choisir la méthode de vaccination pour un vaccin à l'ADN

- Beaucoup d'anticorps
- Intradermique
- beaucoup de cellules tueuses
- intramusculaire
- réponse mixte
- intramusculaire

Premiers essais in vivo (souris)

- Immunisation
  - **intramusculaire**
  - **intradermique**
- rappel après 2 semaines
- échantillons de sang aux semaines 1, 3, 5

Longueur de la réponse immunitaire

Vaccin ADN **Virus atténué**

Bonne réponse immunitaire

Même après 6 mois !!!

Livraison des plasmides par liposome

- Protège de la dégradation
- favorise l'entrée dans les cellules
- favorise l'entrée dans le noyau
- cible des cellules spécifiques
- approuvé par la FDA

Immunisation des bovins

- Vaccins: nu ou avec liposome
- injection intramusculaire
- rappel aux semaines 3 et 6
- provocation à la semaine 16

Anticorps neutralisants

Traitement	Période de vaccination (sem)					Période de provocation (sem)			
	0	6	8	10	12	16	17	18	19
ADN-L (1- 3)	-	-	+	+	+	+	+	+	+
ADN-N (3)	-	-	-	+	+	+	+	+	+

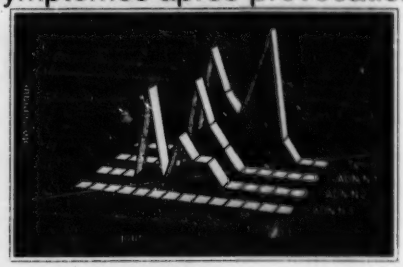
Les témoins étaient négatifs

Sécrétion nasale d'anticorps neutralisants

Traitement	Force des anticorps	
	BVDV type1	BVDV type 2
ADN-L	+++	+
ADN-N	+++	+

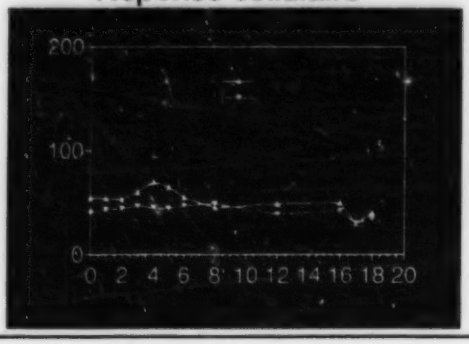
Les témoins étaient négatifs

Symptômes après provocation



Les animaux immunisés à l'ADN-L n'avaient aucune protection

Réponse cellulaire



Vaccin de 2e génération

- Contiendra E2 et autre antigène des virus de types I et II
- plasmide comprendra un stimulant de la réponse immunitaire bovine
- plasmide comprendra 3 séquences d'ADN de plus (forte réponse)
- injection intramusculaire

Coût de développement du vaccin à l'ADN

- De l'idée au prototype protecteur pour les animaux de labo: **$300,000**
- Du prototype à la formulation finale et tests sur bovins: **$600,000**

L'équipe du vaccin ADN

- Université de Sherbrooke
- Brian Talbot, Ph.D.
- Steve St Onge, MSc.
- Université de Montréal
- Youssef Elazhary, DMV, Ph.D.
- Sylvette St Laurent, Ph.D.
- Serge Harpin, Ph.D.
- Majambu Mbikay, Ph.D.

Équipe actuelle

- **Université de Sherbrooke**
  - Brian Talbot, Ph.D.
  - Luizim Shkreta, Ph.D.
  - Eric Brouillette, MSc
- **Centre de R&D sur le bovin laitier et le porc, Lennoxville**
  - Pierre Lacasse, Ph.D.
  - Moussa Diarra, Ph.D.
- **Université de Montréal**
  - Youssef Elazhary, DMV, Ph. D.
  - Sylvette St Laurent, Ph. D.
  - Majambu Mbikay, Ph. D.

Le potentiel des produits à base de peroxyde pour nettoyer les équipements de traite

Susan Springthorpe, Richard Kibbee et Syed A. Sattar
Centre pour la recherche en biologie environnementale, Université d'Ottawa

- Le nettoyage et la désinfection traditionnelle des équipements de traite, y compris l'utilisation du chlore, causent des fentes évidentes à la surface des manchons de caoutchouc noir;
- La surface des manchons de caoutchouc noir traités avec un produit à base de peroxyde d'hydrogène ne montre pas de fentes mais un adoucissement de la surface. Des tests au champ devront démontrer si cela affecte la durabilité du caoutchouc;
- Le chlore et le produit à base de peroxyde l'hydrogène assurent une désinfection équivalente;
- La chaleur est la composante la plus importante de la désinfection.

Ce projet de recherche visait à déterminer si le chlore est la cause des traces noires dans le lait et à estimer si un produit à base de peroxyde d'hydrogène permettait d'éviter ce problème. Nous devions nous assurer que ce produit avait un pouvoir nettoyant et désinfectant au moins égal à celui du chlore. Il s'agit d'un critère important pour l'adoption d'un tel produit. En plus d'éviter le problème des traces noires, une des raisons majeures pour le choix du peroxyde est l'absence de résidus toxiques une fois le produit suffisamment dilué. Les producteurs auront aussi à utiliser moins d'eau puisque le peroxyde requiert moins d'étapes de lavage.

Des morceaux de manchons de caoutchouc noir ont été soumis à des cycles de nettoyage quotidiens, avec les deux produits, durant trois mois. Pour détecter de possibles changements dans l'intégrité et la microtopographie du caoutchouc, on a pris des photographies, à intervalles réguliers, à l'aide d'un microscope électronique. Ces photos ont montré l'apparition progressive de fentes à la surface des manchons soumis au traitement à base de chlore. Ces fentes ne sont pas apparues sur les manchons traités au peroxyde d'hydrogène mais dans ce cas-ci, la surface est devenue plus douce et plus uniforme.

Des tests *in vitro* ont comparé l'efficacité des deux produits nettoyants contre des bactéries Gram négatives et Gram positives typiques, déposées ou cultivées en biofilms sur la surface de morceaux de manchons de caoutchouc. Les résultats de ces tests suggèrent que la puissance et l'efficacité des deux produits sont similaires. D'autres tests ont comparé la désinfection du caoutchouc par les deux produits après une heure de circulation de lait cru sur les surfaces de caoutchouc. Encore là, les deux produits ont affiché des résultats semblables. Des expériences, conduites à différentes températures, ont montré qu'à des températures plus élevées, il y avait moins de bactéries qui survivaient à la désinfection, quelque soit le produit utilisé. À mesure que la température descent vers les 40°C, davantage de microorganismes survivent dans les deux cas.

Nos résultats démontrent qu'il y a une place pour des désinfectants à base de peroxyde d'hydrogène dans l'industrie laitière, mais des tests au champ appropriés seront nécessaires lors de la poursuite de nos travaux.

Notes biographiques

Susan Springthorpe

Susan Springthorpe est assistante de recherche à l'Université d'Ottawa et Directrice de recherche au Centre de recherche en microbiologie environnementale. Elle a reçu des diplômes universitaires de Sheffield (Royaume-Uni) et d'Ottawa et a travaillé en microbiologie environnementale durant 30 ans. Elle se spécialise dans les contrôles environnementaux et la désinfection. Elle a produit plusieurs publications sur le nettoyage, la désinfection et la stérilisation.

Susan Springthorpe, Directrice adjointe
Centre pour la recherche en microbiologie environnementale [CREM]
Département de biochimie, microbiologie et immunologie
Université d'Ottawa
451 Smyth Road
Ottawa, ON K1H 8M5

Téléphone: 613-562-5800 poste 8313
Télécopieur: 613-562-5452/5610
Courriel: sspring@uottawa.ca

Un produit a base de peroxyde pour nettoyer les équipements de traite

Susan Springthorpe, Richard Kibbee et Syed A. Sattar

Centre de recherche en microbiologie environnementale
Université d'Ottawa

Introduction

- **Traces noires dans le lait**
- **Nature du problème**
  - Effet du chlore sur le caoutchouc?
  - Surutilisation des parties de caoutchouc?
- **Éviter le problème grâce à un autre nettoyant ?**
- **H_2O_2 peut-il être équivalent?**

Objectifs de l'étude

- **Déterminer si les produits à base de peroxyde d'hydrogène sont adéquats pour remplacer le chlore dans l'industrie laitière.**
- **Déterminer, par des essais parallèles sur le chlore et sur une formulation basée sur le peroxyde d'hydrogène (accéléré et stabilisé), si l'autre nettoyant prévient les traces noires tout en tuant autant les bactéries.**

Comparaison des nettoyants

200 ppm chlore	Peroxyde d'hydrogène accéléré
➠ oxydant - rapide	➠ oxydant - rapide
➠ neutralisé rapidement – requiert surfaces propres	➠ agit comme nettoyant et désinfectant
➠ conc. limitée pcq contact avec aliments	➠ concentration plus élevée pour contact avec aliments
➠ alkalin	➠ acide faible
➠ résidus toxiques	➠ pas de résidus toxiques

Vue laitée, janvier 2001

Étapes de l'étude

➠ **Intégrité du caoutchouc**
- Manchons, exposés aux deux régimes de désinfection chaque jour durant 124 jours – évaluation visuelle et au microscope électronique
- Tuyau de caoutchouc et lait cru – examen macroscopique de frottis pour la dégradation du caoutchouc

➠ **Comparer l'efficacité désinfectante**
- Organismes cultivés en labo sur coupons de caoutchouc
- Organismes dans lait cru a différentes températures

Vue laitée, janvier 2001

Intégrité des manchons

➠ Nouveaux manchons - section cylindrique

➠ Tests en parallèle avec les deux désinfectants

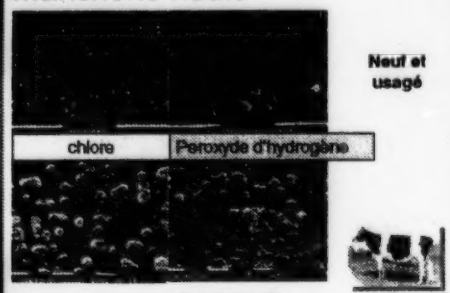
➠ Un cycle conventionnel au chlore par jour mais 200 min d'exposition au chlore

➠ Un cycle modifié pour le pexoxyde d'hydrogène
- Rinçage à l'eau tiède, 550 ppm H_2O_2 jusqu'à la prochaine traite, 275 ppm durant 20 minutes (pas besoin de neutralisant)

➠ Étude sur 4 mois avec manchons

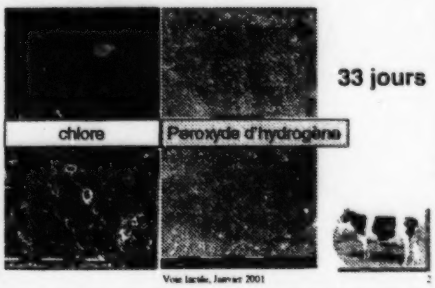
Vue laitée, janvier 2001

Manchons neufs



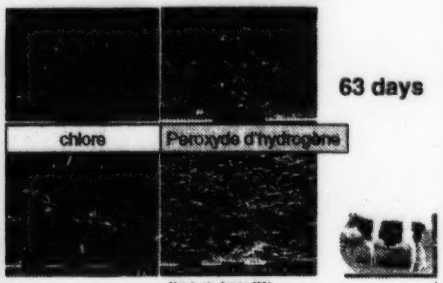
Neuf et usagé

Manchons - simulation



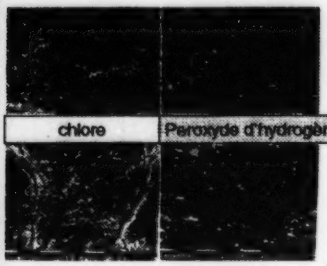
33 jours

Manchons - simulation

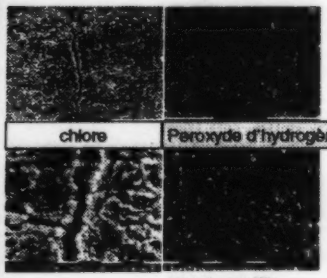


63 days

Manchons - simulation



Manchons - simulation

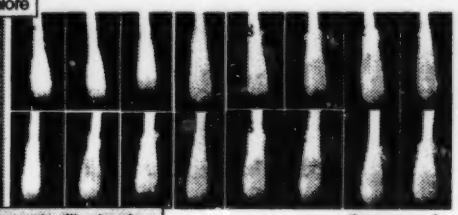


Intégrité des tuyaux

- **Parois épaisses – difficiles avec MEB**
- **Intégrité vérifiée avec circulation de lait cru avant désinfection**
- **Tuyau attaché en sections – 2 sections prélevées aux 7 jours durant 56 jours**
- **Frottis pour évaluer les dommages à la paroi interne**

Effet macroscopique sur les tuyaux

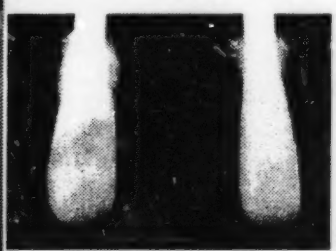
chlore



Peroxyde d'hydrogène

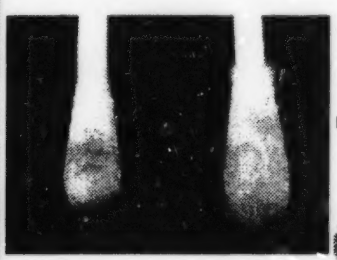
ours d'exposition, 2 cycles par jour

Effet sur les tuyaux



28 jours
[2 cycles par jour]

Effet sur les tuyaux



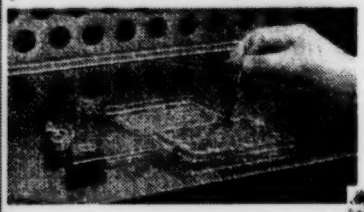
56 jours
[2 cycles par jour]

Bactéries cultivées

- Coupons provenant des manchons
- Spores de Bacillus subtilis et Clostridium sporogenes, Enteroccus faecalis et Staphylococcus aureus – déposé et séché
- Pseudomonas aeruginosa – cultivé (biofilm)
- Exposé aux désinfectants à des températures fixes durant 10 ou 20 minutes
- Survivants filtrés et comptés, mortalité calculée relative aux témoins non-traités

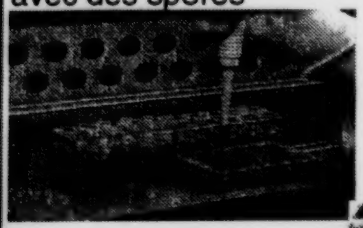
Voir leçon, janvier 2001 1

Les coupons stériles sont placés dans un plateau



Voir leçon, janvier 2001 2

Les coupons sont inoculés avec des spores



Voir leçon, janvier 2001 3

On recueille les survivants sur les coupons

Réductions des bactéries - log

Concentration des désinfectants	S. aureus	S. aureus	S. aureus
200 ppm CT	4.3	4.5	5.9
100 ppm CT	2.1	2.3	3.9
550 ppm H_2O_2	5.4	7.8	7.8
275 ppm H_2O_2	4.8	4.5	6.9

Concentration des désinfectants	E. faecalis	E. faecalis	E. faecalis
200 ppm CT	4.8	3.3	4.4
100 ppm CT	1.8	1.0	1.7
550 ppm H_2O_2	6.1	6.7	7.6
275 ppm H_2O_2	4.9	5.5	5.6

Concentration des désinfectants	P. aeruginosa	P. aeruginosa	P. aeruginosa
200 ppm CT	3.8	4.9	5.2
100 ppm CT	2.7	3.1	2.2
550 ppm H_2O_2	6.2	5.9	5.7
275 ppm H_2O_2	3.9	4.8	3.9

Temps de contact = 10 min
Température ambiente

Vous lactée, janvier 2001

1

Réduction des spores – log

Concentration des désinfectants	C. sporogenes	C. sporogenes	C. sporogenes
200 ppm CT	4.9	4.2	5.3
100 ppm CT	2.7	2.7	4.1
550 ppm H_2O_2	5.0	4.6	4.5
275 ppm H_2O_2	3.1	3.5	2.9

Concentration des désinfectants	B. subtilus	B. subtilus	B. subtilus
200 ppm CT	4.9	4.2	5.3
100 ppm CT	2.7	2.7	4.1
550 ppm H_2O_2	5.0	4.6	4.5
275 ppm H_2O_2	3.1	3.5	2.9

Temps de contact = 20 min à 60°C

Vous lactée, janvier 2001

2

Expérience sur le lait cru

- **Lait cru provenant de fermes**
- **Passage de lait cru, puis de détergents, à température fixe**
- **Lait cru circulé durant 1 heure, suivi du cycle de désinfection en parallèle durant 10 minutes – 2 cycles par jour**
- **Échantillons hebdomadaires après la traite et le nettoyage**

Vous lactée, janvier 2001

3

Bactéries– lait cru

Temp. du cycle	Désinfectant du cycle	Organismes récupérés
70°C	chlore	*Bacillus subtilis, Bacillus cereus I, Bacillus cereus II*
	peroxyde d'hydrogène	*Bacillus subtilis, Bacillus cereus I*
50°C	chlore	*Bacillus subtilis Bacillus cereus I, Staphylococcus epidermidis, staphylococcus sp.*
	peroxyde d'hydrogène	*Bacillus subtilis Bacillus cereus I, Bacillus cereus II, Staphylococcus aureus, Staphylococcus sp.*
45°C	chlore	*Bacillus subtilis Bacillus cereus I, Bacillus cereus II, Bacillus sp. Staphylococcus aureus, Staphylococcus sp., Staphylococcus epidermidis*
	peroxyde d'hydrogène	*Bacillus cereus I, Bacillus sp. Staphylococcus aureus, Staphylococcus sp., Staphylococcus epidermidis*
40°C	chlore	*Bacillus subtilis Bacillus cereus I, Staphylococcus aureus, Staphylococcus sp., Stomatophaematos multivirulis, Diphtheroid*
	peroxyde d'hydrogène	*Bacillus subtilis, Bacillus cereus II, Staphylococcus aureus, Staphylococcus sp., Staphylococcus epidermidis, Stomatophaematos multivirulis*

Conclusions – intégrité

- Le chlore cause des fentes sur les surfaces en caoutchouc noir des manchons
- Les surfaces des manchons traités au peroxyde d'hydrogène sont uniformes et plus douces
- Les deux désinfectants ont des effets sur le caoutchouc – pas de réponse pour les traces noires
- Doit voir l'effet à long terme sur l'intégrité des manchons

Conclusions – désinfection

- Les deux produits sont équivalents contre les organismes de labo et du lait cru, même à des températures aussi basses que 40°C
- Des tests au champs doivent être faits avant de faire des recommandations
- Rien ne bat la chaleur!

Bénéfices possibles

- Peut-être prévenir les traces noires
- Désinfection équivalente ou supérieure
- Réduire les résidus toxiques dans l'environnement
- Économies possible d'eau et d'énergie
- Potentiel pour plus de standardisation
- Possibles économies d'$$$

Remerciements

- **Harold Cuthbertson**
- **Dennis McKnight & Albert Koekkoek**
- **Patrick Lecavalier et Alfa Laval, Canada**
- **Ron Riley**
- **Personnel de l'étable laitière de la Ferme expérimentale centrale**
- **Producteurs laitiers du Canad**

L'a b c des protéines: du champ au berlingot!

Hélène Lapierre
Centre de recherche et de développement sur le bovin laitier et le porc, Agriculture et Agroalimentaire Canada

- Chez les ruminants, la quantité et le profil d'acides aminés qui arrivent à la glande mammaire sont totalement différents de ceux présents dans les aliments ;
- Afin de nourrir adéquatement la glande mammaire, il est impératif de pouvoir déterminer la quantité totale et lesquels des acides aminés lui parviennent vraiment.

Le paiement du lait selon les composants et les pressions environnementales des dernières années ont favorisé l'optimisation du transfert des protéines alimentaires aux protéines du lait. Mais tout d'abord, qu'est-ce qu'une protéine? Une protéine est une chaîne d'acides aminés et contrairement aux sucres et aux gras, elle contient de l'azote. Il existe 20 acides aminés servant à fabriquer des milliers de protéines nécessaires au bon fonctionnement d'un animal. Les acides aminés sont comme l'alphabet et les protéines sont comme les mots. Comme 26 lettres suffisent pour écrire tous les mots d'un dictionnaire français, 20 acides aminés suffisent pour fabriquer toutes les protéines. Mais, tout comme les lettres d'un mot, les acides aminés doivent être placés selon un ordre très précis pour que la protéine puisse remplir son rôle. Un acide aminé ne peut en remplacer un autre. Pour que la glande mammaire fabrique un maximum de protéines, il est donc primordial de lui fournir non seulement la bonne quantité totale d'acides aminés mais aussi la bonne proportion de chacun des acides aminés.

En moyenne, seulement 30 % de l'azote ingéré par une vache est transféré dans le lait : 30% se retrouve dans les fèces et 40 % dans l'urine. Cette inefficacité relative est due à plusieurs facteurs. L'azote non-protéique en est un. Tous les acides aminés contiennent de l'azote, mais tout l'azote de la ration n'est pas pour autant sous forme d'acides aminés. Par exemple, les analyses de fourrages sont souvent trompeuses. Quand on analyse la protéine, c'est en fait l'azote qui est mesuré et ensuite multiplié par un facteur de conversion, fiable lorsque tout l'azote est présent sous forme de protéines. Mais certains ensilages peuvent contenir jusqu'à 80 % de leur azote sous forme non-protéique. On peut comparer cet azote à des lettres d'un alphabet étranger... par exemple, des caractères chinois ne peuvent pas du tout nous aider à écrire un mot en français. Grâce à la microflore du rumen, une partie de cet azote peut être reconverti en acides aminés. Mais si les microorganismes du rumen sont un atout indéniable afin de transformer ces caractères chinois en lettres utiles, ils compliquent sérieusement la prédiction des quantités et des proportions de lettres qui seront finalement disponibles à l'animal. Ils modifient complètement la quantité et la forme des composants azotés passant de la ration à la circulation sanguine.

Ultimement, ce seront les acides aminés qui rejoindront la circulation sanguine qui pourront atteindre la glande mammaire et fabriquer des protéines. Il s'avère donc essentiel de quantifier les acides aminés qui sont effectivement absorbés. Globalement, la quantité de bonnes lettres absorbées représente de 35 à 40 % de l'ensemble de tous les caractères présents dans la ration. Une fois dans le sang, il reste un obstacle majeur à franchir avant d'arriver à la glande mammaire : le foie. Il utilise de 0 à 100 % des acides aminés absorbés, selon l'acide aminé lui-même et selon les besoins de l'animal

et son alimentation. Pas facile de prédire ce qui finalement ira irriguer la glande mammaire! Or, c'est seulement en quantifiant cet apport que nous pourrons l'ajuster aux besoins de la glande mammaire.

Notes biographiques

Hélène Lapierre

Hélène Lapierre est chercheure au Centre de recherche et de développement sur le bovin laitier et le porc (Lennoxville, Québec) d'Agriculture et Agroalimentaire Canada. Sa recherche vise à améliorer l'efficacité de l'utilisation de l'azote par une meilleure connaissance du métabolisme intermédiaire des composants azotés. Les résultats de sa recherche permettront de réduire les coûts d'alimentation et les déjections azotées dans l'environnement. Elle a obtenu son baccalauréat et sa maîtrise de l'Université Laval, son doctorat de l'Université de Sherbrooke et a fait un stage post-doctoral au Centre de recherche du USDA à Beltsville, MD. Elle a rédigé comme auteure/co-auteure plus de 55 articles dans des revues scientifiques et plus d'une centaine de présentations lors de congrès scientifiques ou de vulgarisation.

Hélène Lapierre
Centre de recherche et de développement
sur le bovin laitier et le porc
B.P. 90, 2000 route 108 Est
Lennoxville, QC J1M 1Z3

Téléphone : 819-565-9174, poste 234
Télécopieur : 819-564-5507
Courriel : lapierreh@em.agr.ca

L' A B C des protéines

Centre de recherche et de développement
sur le bovin laitier et le porc, Lennoxville

Agriculture et Agroalimentaire Canada / Agriculture and Agri-Food Canada — Canada

Hélène Lapierre, AAC, Lennoxville
Robert Berthiaume, AAC, Lennoxville
Carole Thivierge, Université Laval

Centre de recherche et de développement
sur le bovin laitier et le porc, Lennoxville

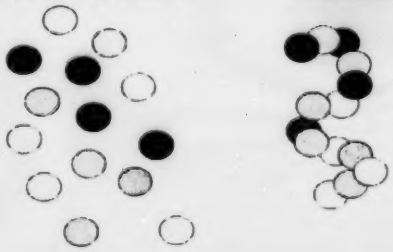
Agriculture et Agroalimentaire Canada / Agriculture and Agri-Food Canada — Canada

Nous discuterons:

- Utilisation globale de l'azote
- Acides aminés
- Disparition intestinale
- Absorption portale
- Extraction par le foie
- Glande mammaire
- Implications pratiques

Qu'est-ce qu'une protéine?

Acides aminés **Protéine**

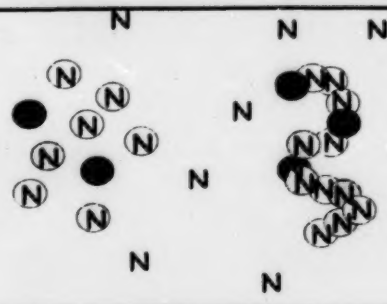


Qu'est-ce qu'une protéine?

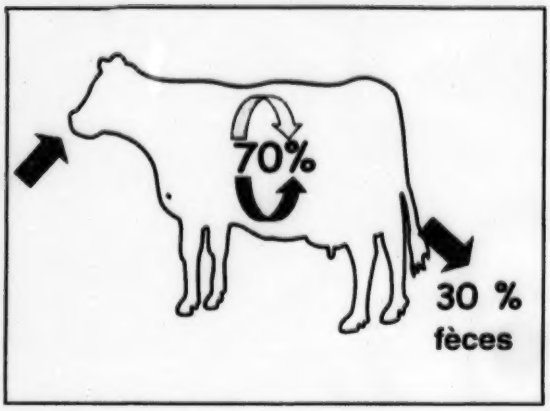
Protéine

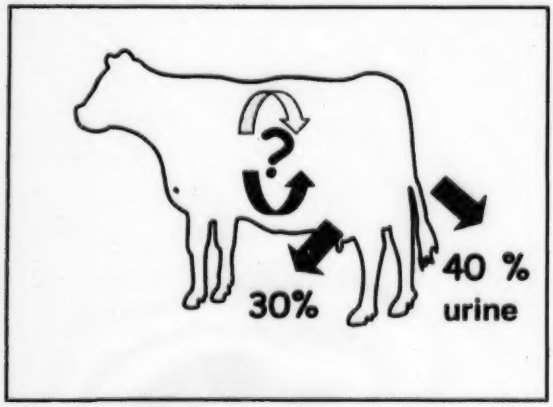
Gras
Sucre

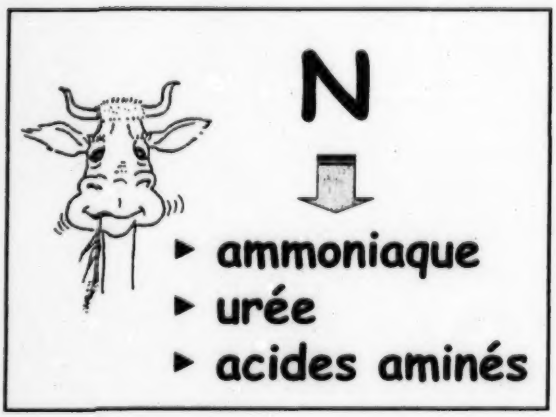
Qu'est-ce qu'une protéine?

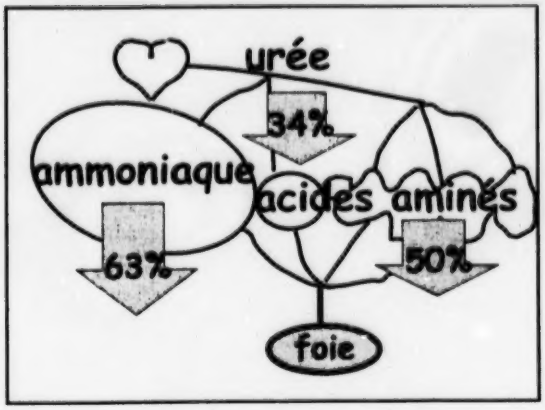


CASÉINE

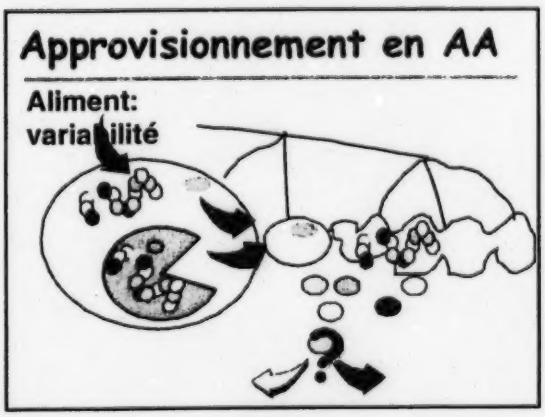

70%
30 %
fèces


?
40 %
urine
30%

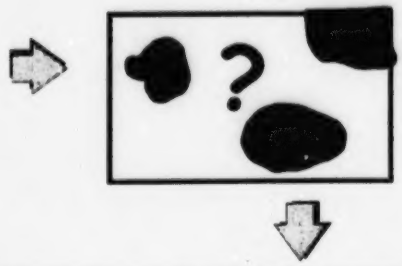

N
ammoniaque
urée
acides aminés


urée
34%
ammoniaque
acides aminés
63%
50%
foie

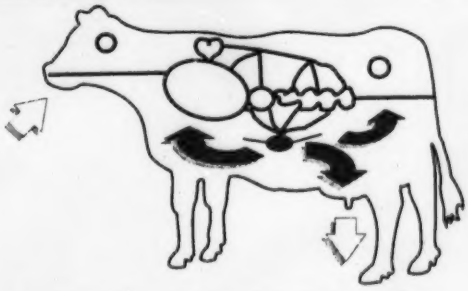
Acides aminés


Approvisionnement en AA
Aliment:
variabilité
?

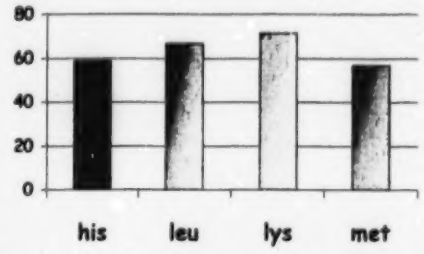
Besoins



Besoins

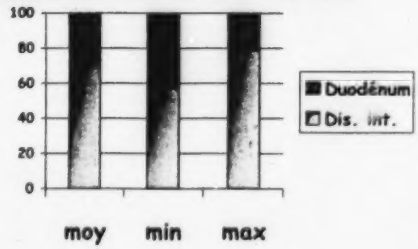


Digestibilité intestinale apparente (%)

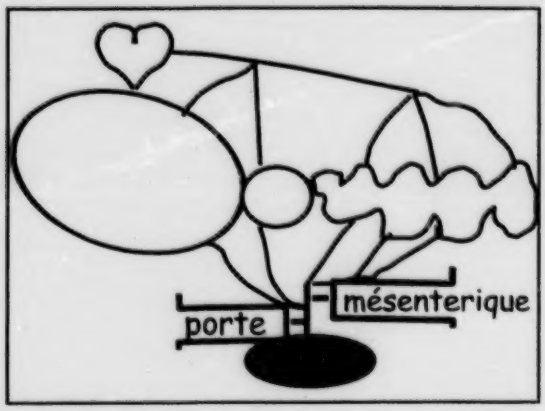


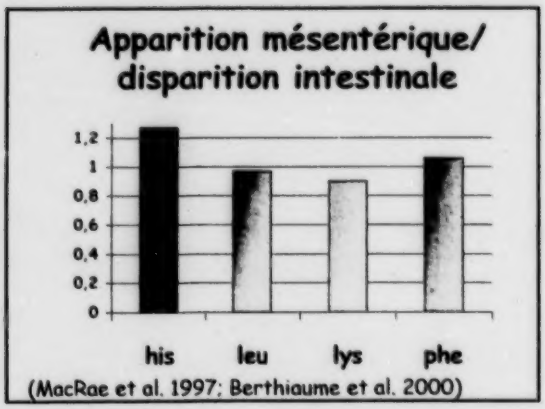
(Coomer et al. 1993; Berthiaume et al. 2000)

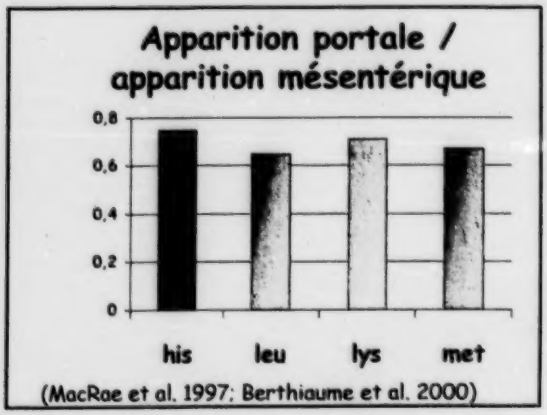
Résumé:
<u>disparition intestinale</u>



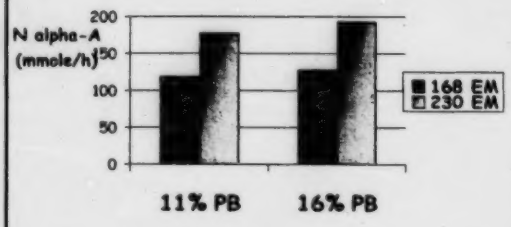
Absorption dans la circulation sanguine


porte
mésenterique


Apparition mésentérique/
disparition intestinale
1,2
1
0,8
0,6
0,4
0,2
0
his
leu
lys
phe
(MacRae et al. 1997; Berthiaume et al. 2000)

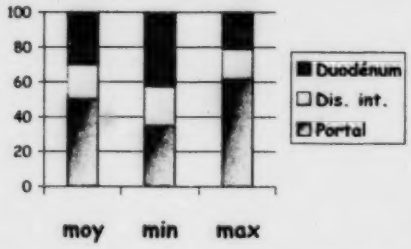

Apparition portale /
apparition mésentérique
0,8
0,6
0,4
0,2
0
his
leu
lys
met
(MacRae et al. 1997; Berthiaume et al. 2000)

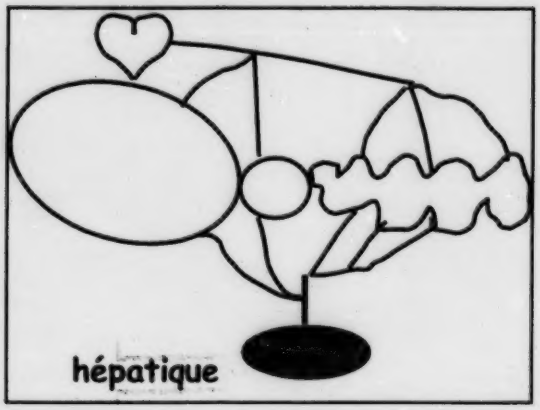
Absorption portale d'AA



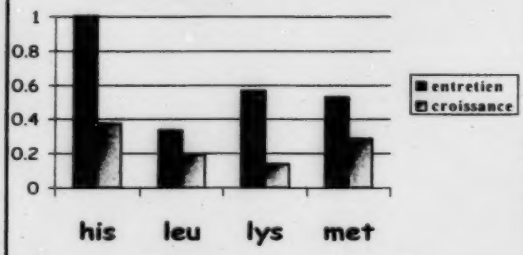
(Reynolds et al. 1991)

Résumé: approvisionnement portal



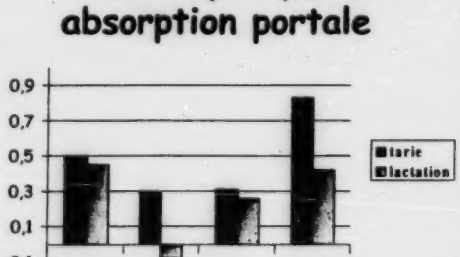


Extraction hépatique d'AA/ absorption portale



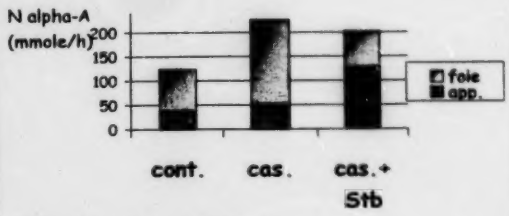
(Lobley et al. 1996, Lapierre et al. 2000)

Extraction hépatique d'AA/ absorption portale



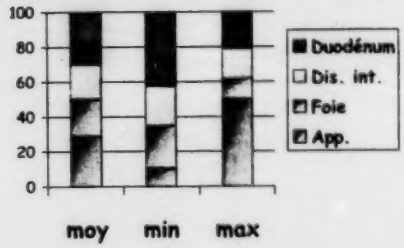
(Wray-Cahen et al. 1997, Berthiaume et al. non-publié)

Extraction hépatique *vs* approvisionnement aux tissus

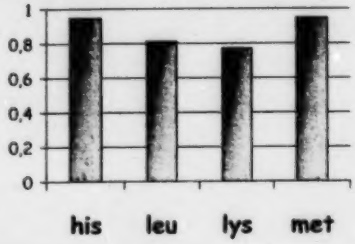


(Bruckental et al. 1997)

Résumé:
approvisionnement post-hépatique

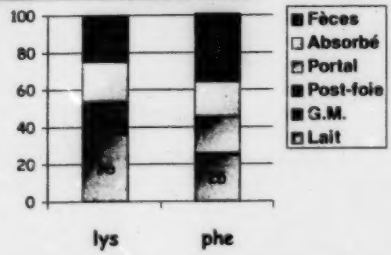


Sécrétion dans le lait/ prélèvement mammaire



(Thivierge et al. non-publié)

Résumé:
lait / duodénum



Et maintenant?

Acides aminés limitants

CASÉINE
CASÉINE

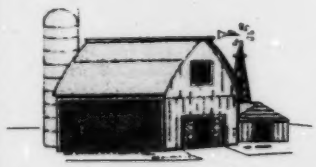
\+ I I

Acides aminés limitants

CASÉINE
CASÉINE
CASÉINE
CASÉINE

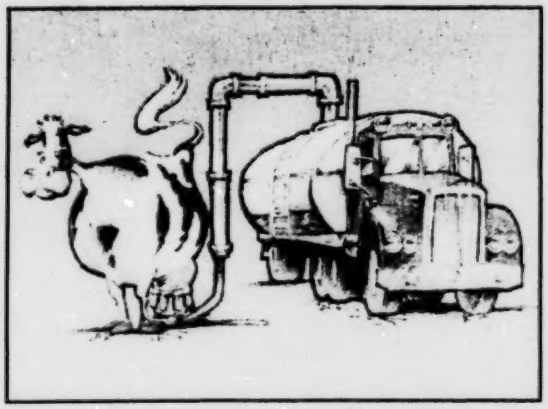
Équilibre:

Approvisionnements = besoins



Expression des besoins

- Pourcentage
- Quantité totale
- Relation-énergie



Exemple:

Équilibrer pour *AA*
- 16.8 vs 17.6 % P.B.
- $0.08/vache x jour

(Armentano, 2000)

Comment y arriver?

1) Maximiser protéine microbienne
   = suffisamment de:
   -> NDF, HCNS
   -> protéine dégradable
2) Dégradabilité ruminale faible
3) Acides aminés protégés

Merci

- Agriculture et Agroalimentaire Canada
- Degussa Hüls Canada inc.
- FPLQ
- Novalait inc.

Les enzymes dans la ration des vaches laitières: quoi de neuf ?

T. A. McAllister
Centre de recherches de Lethbridge, Agriculture et Agroalimentaire Canada

- L'ajout d'enzymes peut augmenter la production laitière;
- Les enzymes agissent sur plusieurs mécanismes différents pour améliorer la digestion;
- Les vaches fortes productrices, pour lesquelles la digestion des fibres est plus laborieuse, sont celles qui bénéficient le plus d'une supplémentation;
- Les diètes supplémentées en enzymes peuvent nécessiter un contenu supérieur en fibre efficace;
- Élucider le mécanisme d'action des enzymes peut conduire au développement d'enzymes encore plus performants.

Les enzymes sont des protéines naturelles produites par des cellules vivantes et qui agissent comme catalyseurs dans les réactions biochimiques. La digestion d'aliments complexes tels que les fourrages et les grains requiert la participation de centaines d'enzymes. Les préparations d'enzymes pour ruminants sont vendues principalement pour leur capacité à dégrader les parois cellulaires des plantes. Il s'agit le plus souvent de cellulases ou de xylanases. Les résultats obtenus avec la supplémentation d'enzymes sont fonction du type de préparation ainsi que du type d'animal supplémenté. L'ajout d'enzymes a augmenté la production de lait chez des vaches laitières et a amélioré l'efficacité alimentaire chez des bouvillons.

Plusieurs études ont tenté de définir le mode d'action de ces additifs dans les diètes pour ruminants. Les enzymes commencent à digérer la fibre alimentaire peu de temps après leur application. Cette action des enzymes accroît le taux de digestion ultérieure de la fibre au niveau du rumen et augmente le nombre et l'activité des bactéries responsables de la digestion des aliments dans le rumen. Tout semble indiquer que plusieurs de ces enzymes demeurent actifs dans le rumen et complémentent l'activité digestive des microorganismes. Ceci semble particulièrement vrai lorsque la digestion de la fibre est diminuée à cause d'un faible pH ruminal.

La connaissance du mode d'action des enzymes devrait permettre aux chercheurs de mettre au point des suppléments d'enzymes spécifiques au type d'aliment servi et ainsi améliorer la valeur nutritive des diètes pour vaches laitières. Au cours de cette présentation, nous discuterons des stratégies de recherche pouvant être explorées afin d'accroître la valeur des suppléments d'enzymes ajoutés aux rations des vaches laitières.

Notes biographiques

Tim McAllister

Tim McAllister a fait une maîtrise en biochimie animale à l'Université de l'Alberta. Il a obtenu son doctorat en microbiologie du rumen et nutrition de l'Université de Guelph en 1991. Il a par la suite obtenu une bourse postdoctorale du CRSNG (Conseil de la recherche en sciences naturelles et génie) afin de continuer ses travaux à l'Université de Calgary sur la relation entre la formation de biofilms microbiens et la digestion des aliments. En 1993, il a été engagé au Centre de recherches de Lethbridge où, après avoir travaillé successivement comme technicien et biologiste, il a été promu chercheur scientifique. Il dirige présentement une équipe qui étudie le traitement des céréales, les enzymes pour les ruminants, l'écologie du rumen, la régie alimentaire et le génie génétique. M. McAllister est auteur de plus de 100 publications scientifiques. Il est aussi lauréat du Prix Pfizer du Jeune Scientifique et du Prix des industries animales canadiennes pour la vulgarisation et le service au public pour ses travaux en production de boeuf au Canada.

Tim McAllister
Centre de recherche
Agriculture et Agroalimentaire Canada
B.P. 3000 Main
Lethbridge AB T1J 4B1

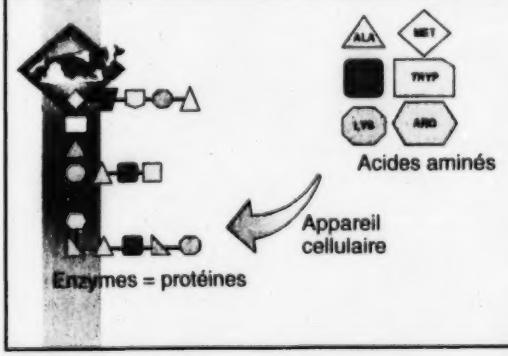
Téléphone : 403-317-2240
Télécopieur : 403-382-3156
Courriel: mcallister@em.agr.ca

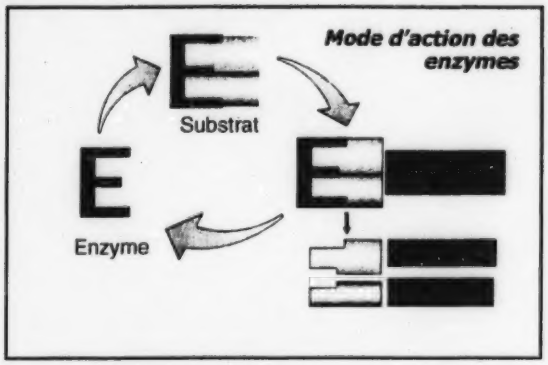
Les enzymes dans la ration des vaches laitières: quoi de neuf?

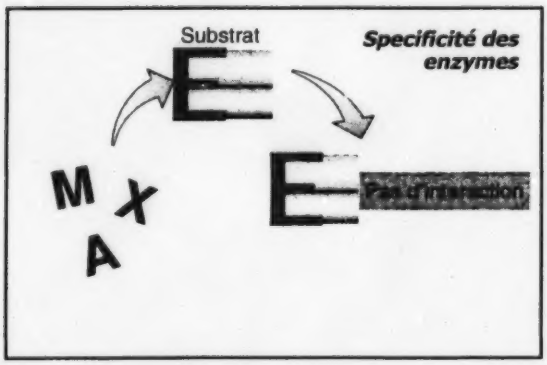
T. A. McAllister, Karen Beauchemin, Lyle Rode, A. Hristov and Y. Wang

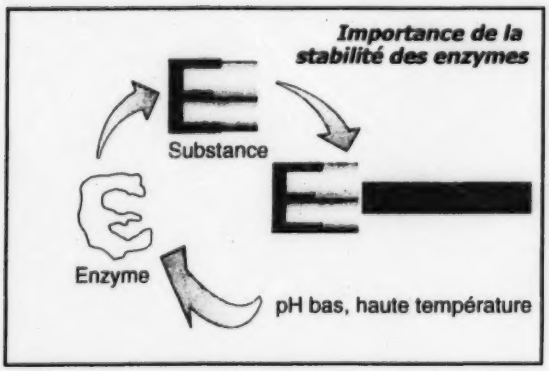
Au menu

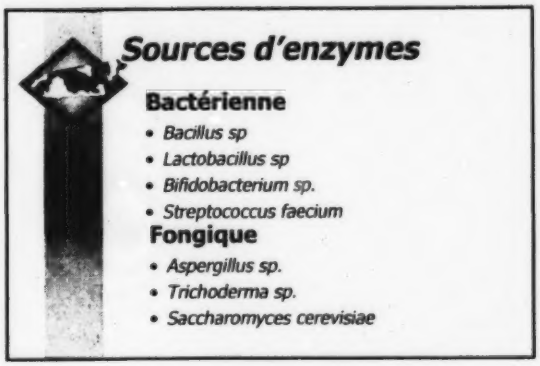
- Un enzyme, c'est quoi ?
- Mode d'action
- Effet sur les performances
- Vers l'avenir



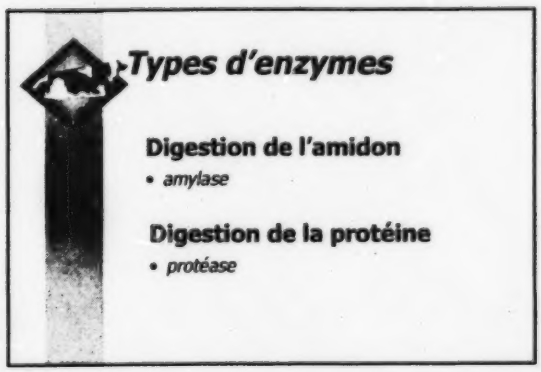

Mode d'action des enzymes
Substrat
Enzyme


Substrat
Specificité des enzymes
M
A
X


Importance de la stabilité des enzymes
Substance
Enzyme
pH bas, haute température


Sources d'enzymes
Bactérienne
• Bacillus sp
• Lactobacillus sp
• Bifidobacterium sp.
• Streptococcus faecium
Fongique
• Aspergillus sp.
• Trichoderma sp.
• Saccharomyces cerevisiae

Types d'enzymes
Digestion de la fibre
• cellulase
• hemicellulase
• xylanase
• pectinase
• beta-glucanase
• endoglucanase


Types d'enzymes
Digestion de l'amidon
• amylase
Digestion de la protéine
• protéase

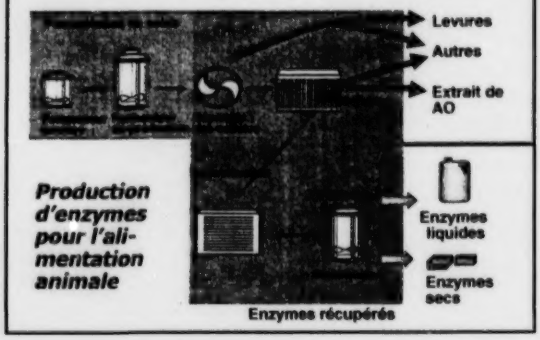
Activité des enzymes

Unités

- produit dégagé par unité de temps

Les conditions d'analyse ne sont pas standardisées

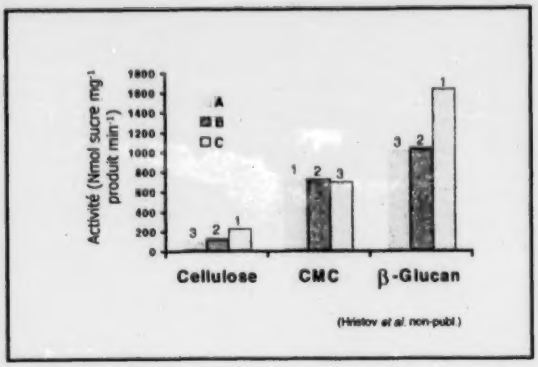
- pH, tampons, température
- type de substrat

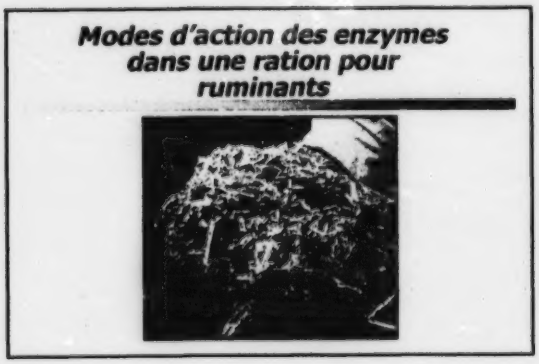


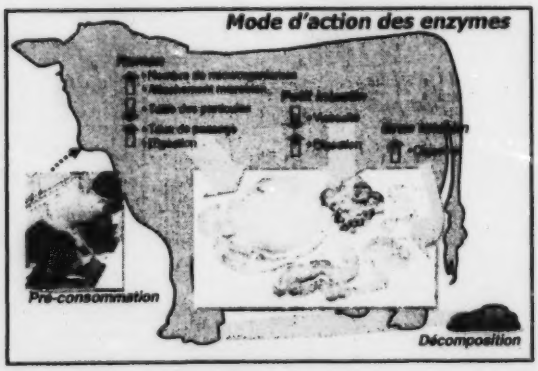
Production d'enzymes pour l'alimentation animale

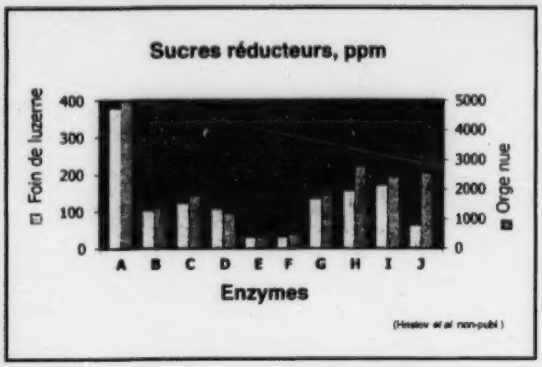
Activité polysaccharidase relative de 4 enzymes alimentaires

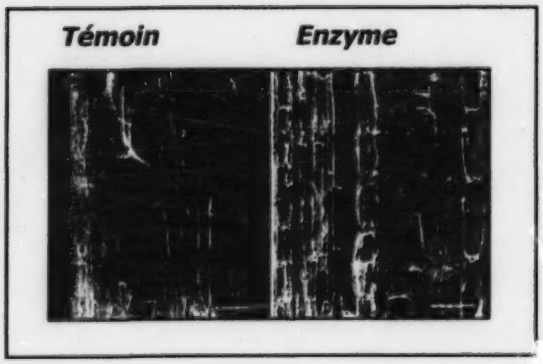
Enzyme	A	B	C	D
Cellulase	100	100	100	100
α-amylase	85.1	7.37	66.0	ND
β-glucanase	357	503	369	101
Cellulase	55.9	67.2	56.1	39.2
Cellulose 1, 4-β-cellobiosidase	43.9	57.4	22.8	19.5
Endo-1, 4-β-xylanase	153	90.5	138	130
Licheninase	139	260	134	38.8
Endo-1, 3 (4)-β-glucanase	39.6	116	78.6	20.8

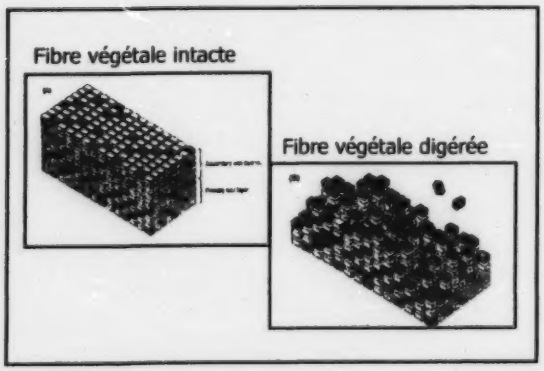

Activité (Nmol sucre mg-1 produit min-1)
1800
1600
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
A
B
C
3 2 1
1 2 3
3 2 1
Cellulose
CMC
β-Glucan
(Hristov et al. non-publ.)

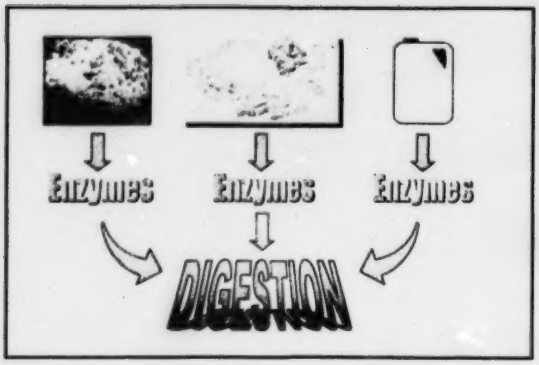

Modes d'action des enzymes dans une ration pour ruminants

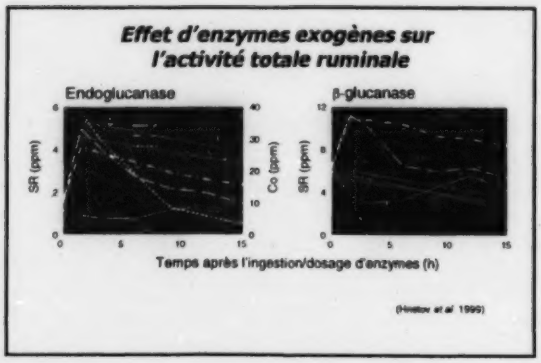

Mode d'action des enzymes
Pré-consommation
Décomposition

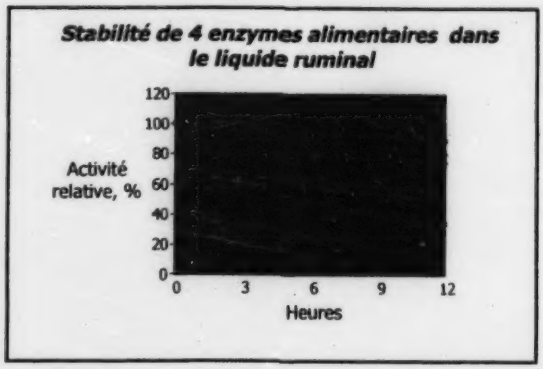

Sucres réducteurs, ppm
Foin de luzerne
Orge nue
400
300
200
100
0
5000
4000
3000
2000
1000
0
A B C D E F G H I J
Enzymes
(Hristov et al. non-publi.)


Témoin
Enzyme

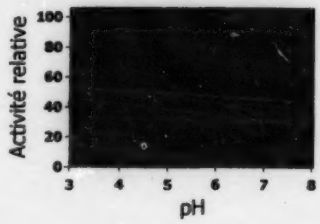

Fibre végétale intacte
Fibre végétale digérée


ENZYMES
ENZYMES
ENZYMES
DIGESTION

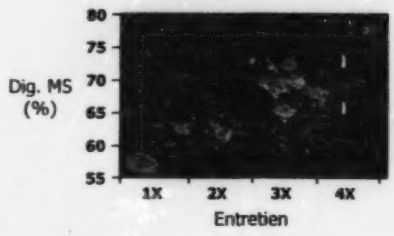

Effet d'enzymes exogènes sur l'activité totale ruminale
Endoglucanase
β-glucanase
SR (ppm)
Co (ppm)
SR (ppm)
Temps après l'ingestion/dosage d'enzymes (h)


Stabilité de 4 enzymes alimentaires dans le liquide ruminal
Activité relative, %
120
100
80
60
40
20
0
0
3
6
9
12
Heures

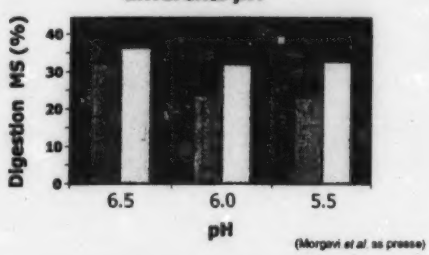
Effet du pH sur l'activité xylanase relative - enzymes alimentaires vs enzymes ruminals



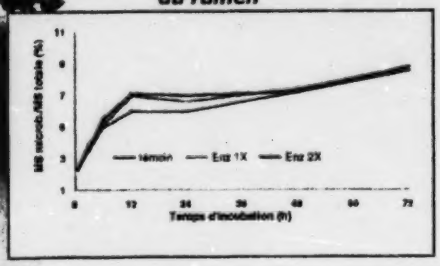
Réduction prévue de la digestibilité (NRC)



Effet des enzymes alimentaires sur la digestibilité d'un ensilage de maïs à différents pH

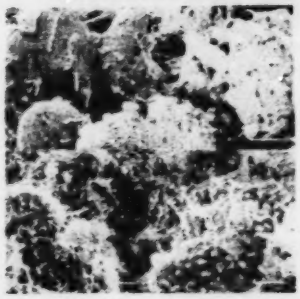


Les enzymes augmentent la colonisation ...articules d'aliments par les microbes du rumen



Plus de microbes

Témoin

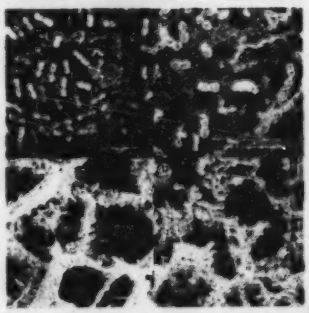


Enzyme

(Wang et al. 2000)

Plus de microbes différents

Témoin



Enzyme

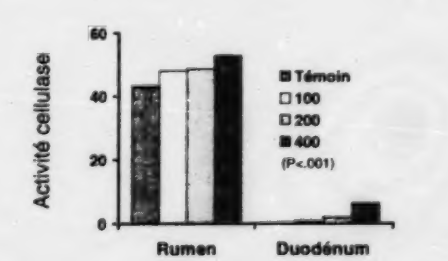
(Wang et al. 2000)

Digestibilité amidon et NDF - vaches en lactation recevant de l'orge et des enzymes

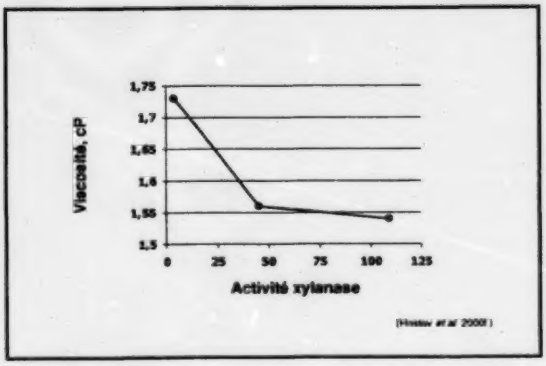
	Diète	
	Orge	Orge + enzymes
Digestibilité amidon		
Rumen	64.9	65.0
Début intestin	46.4	67.5
Totale	82.7	89.2
Digestibilité NDF		
Rumen	57.4	55.8
Début intestin	4.5	11.9
Totale	58.8	61.7

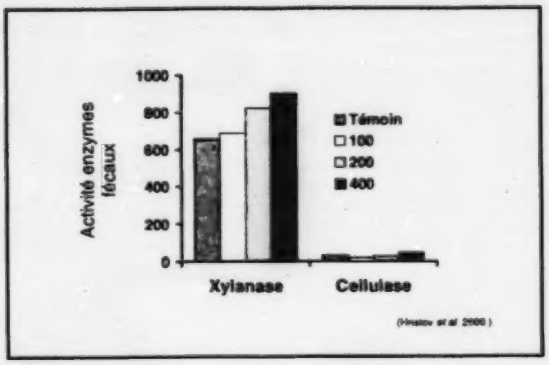
(Beauchemin *et al.* 1999)

(Hristov *et al.* 2000)

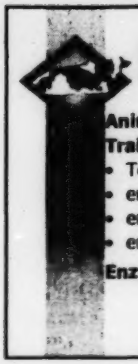


(Hristov *et al.* 2000)





Effet des enzymes sur la production



Dans la ration des vaches laitières

Animaux: vaches en lactation canulées

Traitements:

- Témoin (45 % cubes)
- enzyme bas, sur cubes (L-cubes, 0.5 g kg^{-1})
- enzyme haut, sur cubes (H-cubes, 1.0 g kg^{-1})
- enzyme haut, sur cubes et concentrés (H-cc)

Enzyme: Pro-Mote (Biovance Technol.)

Ingestion et digestibilité

	Témoin	L-cubes	H-cubes	H-cc
Ingestion MS, kg/j	20.4	20.7	20.7	20.8
Digestibilité totale, % matière organique	64.4^{b}	65.9^{ab}	67.0^{a}	66.5^{a}
NDF	38.8^{b}	41.2^{ab}	43.6^{a}	42.4^{ab}

^{ab} $P < 0.05$

L = faible taux d'enzymes dans la diète

H = haut taux d'enzymes dans la diète

Yang et al. 1999

Digestibilité ruminale (%)

	Témoin	L-cubes	H-cubes	H-cc
Matière organique	54.1	54.3	58.4	57.2
Amidon	77.9	74.5	81.2	82.3
NDF	30.7	34.9	36.9	35.6

L = faible taux d'enzymes dans la diète

H = haut taux d'enzymes dans la diète

Yang et al. 1999

Flux de protéines au duodénum (kg/j)

	Témoin	L-cubes	H-cubes	H-cc
Microbienne	1.81[ab]	1.71[b]	2.10[a]	2.03[ab]
Alimentaire	2.05[a]	1.96[ab]	1.60[b]	1.63[b]
Totale	3.86	3.67	3.70	3.63

[a,b] $P < 0.10$

L = faible taux d'enzymes dans la diète

H = haut taux d'enzymes dans la diète

Yang et al. 1999

Production et composition du lait

	Témoin	L-cubes	H-cubes	H-cc
Lait, kg/j	23.7[b]	24.6[ab]	25.6[a]	25.3[ab]
Composition, %				
Gras	3.79	3.70	3.78	3.76
Protéine	3.36	3.41	3.48	3.49

[a,b] $P < 0.05$

L = faible taux d'enzymes dans la diète

H = haut taux d'enzymes dans la diète

Yang et al. 1999

2e étude : Effet des enzymes alimentaires

(1.3 g kg^{-1},sem. 0 -12, 10 vaches/trt)

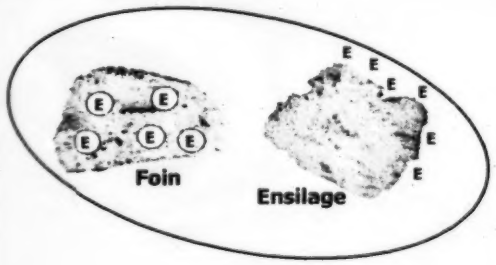
	Témoin	Enzyme
Ingestion MS, kg/j	18.7	19.0
Digestion NDF, %	42.5 [b]	51.0 [a]
Lait, kg/j	35.9 [e]	39.5 [f]
Gras, %	3.87 [a]	3.37 [b]
Protéine, %	3.24	3.03

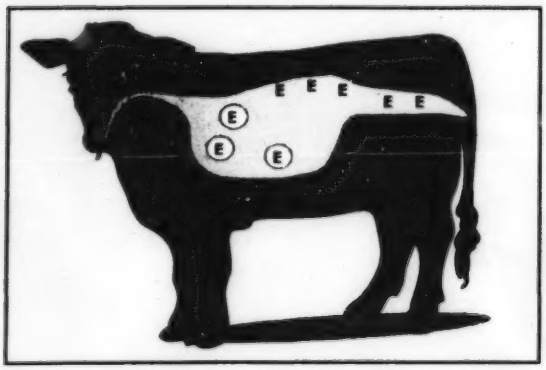
[a,b] $P < 0.05$ [e,f] $P = 0.11$ Rode et al. 1999. JDS 82:2121

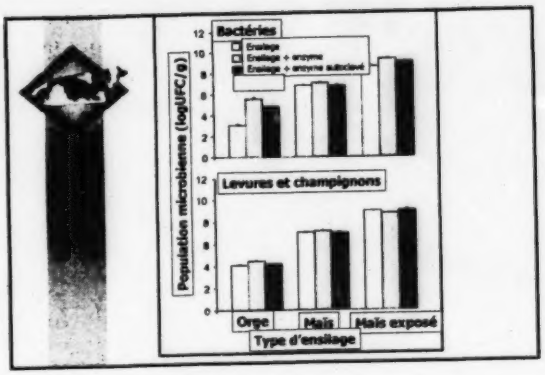
3e étude : Effet des enzymes alimentaires
(1.5 g kg^{-1},sem. 3-15, 15 vaches/trt)

		Enzyme	
	Témoin	**RTM**	**Conc**
Ingestion MS, kg/j	19.4	20.4	19.8
Digestion NDF, %	42.6	45.9	44.3
Lait, kg/j	35.3 ^{b}	35.2 ^{b}	37.4 ^{a}
Gras, %	3.34	3.14	3.19
Protéine, %	3.18	3.13	3.13

^{ab} $P < 0.05$ Yang et al. 2000. soumis à JDS



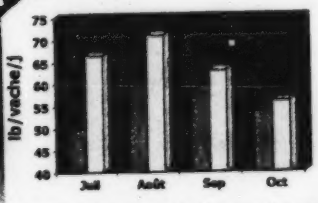




Essai au champ
(McArthur Farms Inc.)

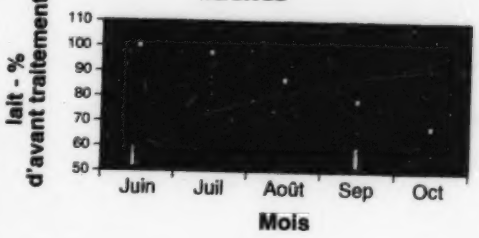
- 1,371 témoins, 627 vaches traitées
- Enzyme = Promote NET (Agribrands Int., St. Louis, MO)
- 5 juin - 25 août 1999
- Floride - canicule
- lait prévu (lbs) :
  - Témoin: 21,672 (2 juin), 21,605 (3 juil.)
  - Enzyme: 18,049 (2 juin), 20,141 (3 juil.)

Production en début de lactation



Les rations n'étaient pas ajustées pour les enzymes.

Essai au champ: toutes les vaches

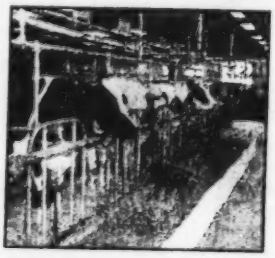


GMQ de bétail à l'engraissement avec et sans enzymes

	Diète		
	TÉMOIN	**ENZ**	**ENZ x 2**
Semi-finition	1.16	1.69	1.71
Finition	1.62	1.63	1.58

(McAllister *et al.* 2000)

Vaches hautes productrices



- + 8 % de lait en mi-lactation
- équilibre énergétique négatif
- réagissent à la digestibilité accrue de la ration

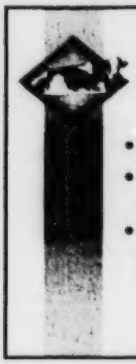
Stratégies pour mieux utiliser les enzymes

Nouvelles sources d'enzymes

- Nouveaux microorganismes
- Nouveaux environnements

Uniformité du produit

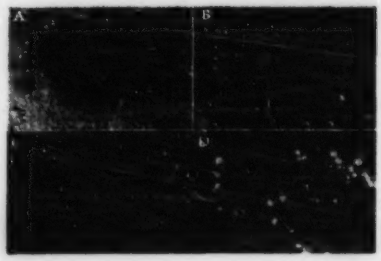
- Substrats de fermentation
- Surfactants
- Préservatifs



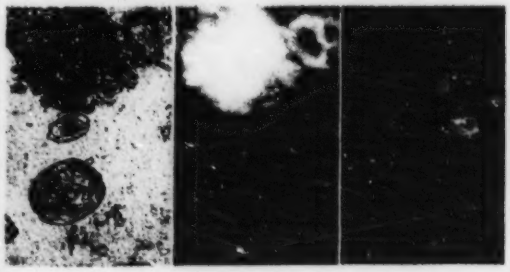
Protection des enzymes

- Réduire la dégradation microbienne
- résister à la dégradation dans l'abomasum
- apporter des enzymes actifs dans le petit intestin

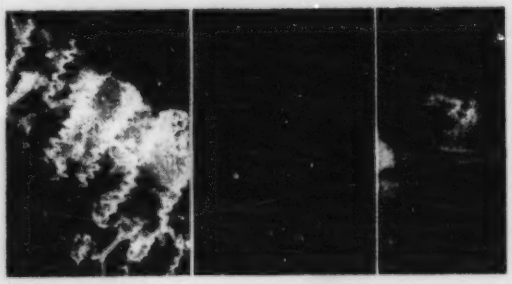
Expression de Pichia



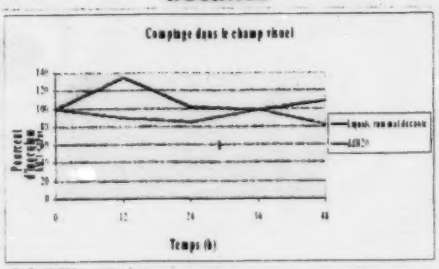
Microscopie par épifluorescence



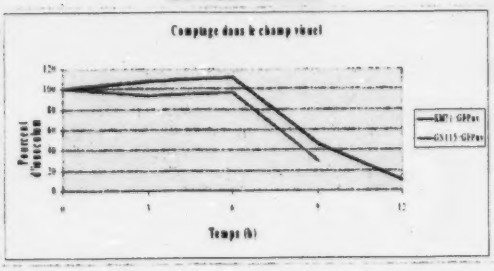
Microscopie par épifluorescence



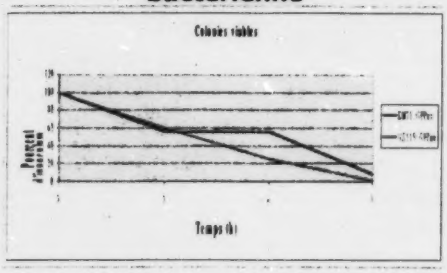
Survie dans le liquide ruminal décanté



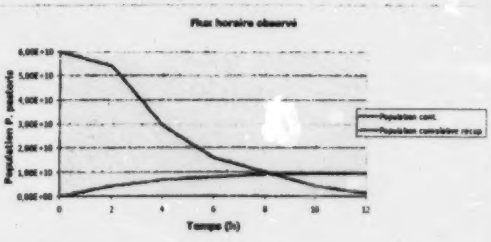
Survie dans la fraction bactérienne



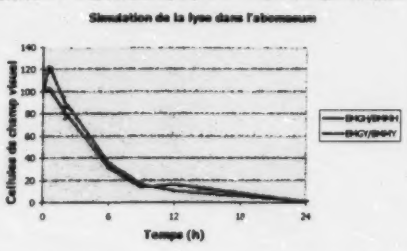
Survie dans la fraction bactérienne



Survie dans RUSITEC



Survie dans le liquide gastrique

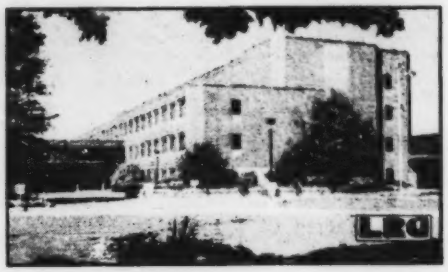


Méthode d'application

- Distribution uniforme
- aliments secs vs ensilage
- interaction enzyme-substrat

Améliorer la constance des effets positifs des enzymes

- Utiliser le bon enzyme
- appliquer le bon taux
- appliquer correctement
- *mode d'action*



Confort des vaches et design de l'étable

Daniel M. Weary[1], Jeffrey Rushen[2] et Anne Marie de Passillé[2]
[1]*Département du bien-être animal, Faculté des Sciences agricoles, Université de la Colombie-Britannique*
[2]*Centre de recherche et de développement sur le bovin laitier et le porc, Agriculture et Agroalimentaire Canada*

- Le confort des vaches est essentiel au maintien de leur santé et de leur productivité ;
- Améliorer la conception des stalles aura les conséquences suivantes : plus de repos, stalle plus utilisée, moins de problèmes de membres et de pieds et enfin, une meilleure production ;
- La recherche nous aide à concevoir des stalles, des recouvrement de sol et des mangeoires mieux adaptés afin d'améliorer le confort des vaches.

Le confort des vaches est un aspect de l'élevage qui prend de plus en plus d'importance pour les producteurs. La recherche démontre maintenant qu'un design d'étable ou de stalle inadéquat peut conduire à un usage réduit des stalles, des problèmes de membres et de pieds et potentiellement une production réduite. Les producteurs réalisent que de meilleures installations peuvent alléger ces problèmes. Malgré cela, il y a eu peu de recherche pour appuyer les recommandations courantes sur le design des stalles.

Cette présentation revoit certaines composantes des stalles et comment elles affectent le confort des vaches. Par exemple, les matelas de géotextile ont la réputation d'être des surfaces confortables. Or, des travaux récents ont démontré que l'utilisation de ces matelas provoque des blessures aux membres des vaches. Les lésions sont plus présentes (91 % des vaches) dans les fermes utilisant des matelas et moins communes (24 % des vaches) dans les fermes utilisant le sable comme recouvrement de sol. Lors d'une autre étude, des vaches sans blessure aux pattes sont passées du pâturage à une étable en stabulation libre. En quelques semaines, ces vaches ont acquis des lésions qui se sont développées plus rapidement si les vaches étaient logées dans des stalles pourvues de matelas que si elles étaient logées sur du sable. Une autre expérience a démontré que si on garde plus de litière sur les matelas, on réduit les chances de blessures.

Même si nos expériences ont démontré que les matelas sans litière sont associés à un plus grand nombre de lésions des membres que les stalles sur litière profonde, les matelas sont supérieurs à d'autres options. Par exemple, des travaux récents ont démontré que les genoux avant des vaches ont moins de chances d'enfler si les vaches sont entravées sur des matelas que sur le ciment. Le recouvrement du sol affecte aussi le temps que la vache passe couchée. Les vaches en stabulation entravée sur matelas passent 1,5 heure par jour de plus couchées que celles sur ciment.

Lors d'une autre expérience, les vaches étaient logées soit dans une stalle conventionnelle avec un plancher de ciment recouvert d'un peu de paille ou dans un enclos spacieux, pourvu d'un matelas de géotextile qui assurait une surface moelleuse. Les vaches dans ces enclos ont passé plus de temps couchées et moins de temps

debout à ne rien faire. Nous travaillons maintenant sur la largeur des stalles et l'emplacement de la barre de cou. Ces facteurs semblent affecter l'utilisation des stalles, de même que leur propreté.

Le confort n'est pas seulement affecté par le design des stalles, mais aussi par le matériel sur lequel les vaches doivent se coucher et le temps passé debout. Le sol et le temps passé debout semblent affecter la santé du pied. La recherche sur les effets des recouvrements de sol ou encore sur des pratiques de régie qui réduisent le temps debout ne fait pourtant que commencer.

Notes biographiques

Dan Weary

Dan Weary occupe une chaire de recherche industrielle du CRSNG en bien-être animal et est professeur associé à la Faculté des sciences agricoles. Il est arrivé à l'Université de la Colombie-Britannique à l'automne 1997, après avoir travaillé comme chercheur pour Agriculture et Agroalimentaire Canada à Ottawa. M. Weary détient un baccalauréat en agriculture et une maîtrise en biologie de l'Université McGill. Il a obtenu son doctorat au département de zoologie d'Oxford et a travaillé comme stagiaire post-doctoral aux universités McGill, Queen's et Concordia.

Le travail de Dan Weary avec le Programme de bien-être animal de l'Université de la Colombie-Britannique se concentre sur la vache laitière. Il tente d'améliorer le logement et la régie de la vache en lactation et du jeune veau.

Dan Weary
Programme de bien-être animal
Faculté des sciences agricoles
2357 Main Mall
Vancouver, BC V6T 1Z4

Téléphone :(604) 822-3954
Télécopieur : (604) 822-4400
Courriel: danweary@onixq.ubc.ca

Confort des vaches et design de l'étable

Daniel M. Weary
Programme en bien-être animal
Université de la Colombie-Britannique

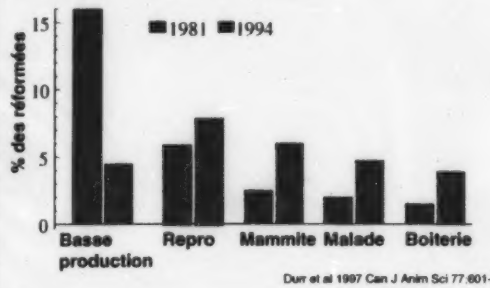
Jeff Rushen et Anne Marie de Passillé
Centre de R&D sur le bovin laitier et le porc, Lennoxville
Agriculture et Agroalimentaire Canada

Le programme en bien-être animal de UBC

Confort des vaches et design de l'étable

Concevoir des environnements qui réduisent le stress et améliorent le bien-être, la santé, la longévité et la productivité.

Les problèmes de santé sont une cause importante de réforme - le logement doit être conçu pour réduire le stress

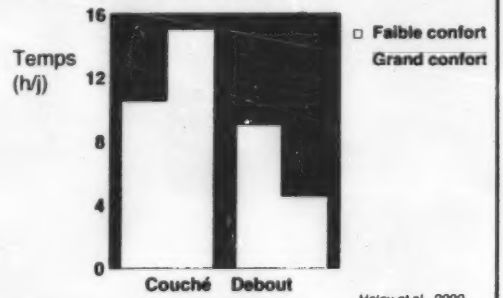


Durr et al 1997 Can J Anim Sci 77:601-608

Importance du repos et du sommeil

Augmente	hormone de croissance croissance des génisses temps de rumination flux sanguin au pis
Réduit	usure des sabots et des membres

Grand enclos confortable = 4 h de plus de repos par jour

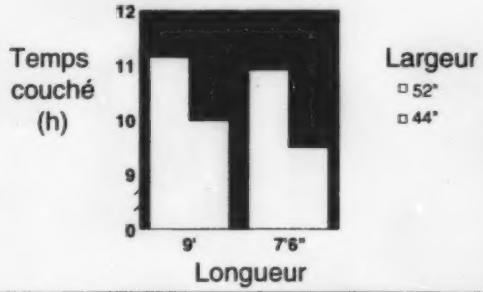


Haley et al., 2000

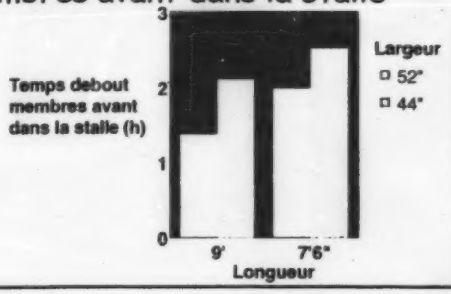
Stalles - recommandations de l'industrie

Mesure	*Bas*	*Haut*
Stalle		
longueur	7'6"	9'
largeur	41"	52"
Barre de cou		
hauteur	37"	50"
distance du mur	60"	77"
Bordure d'arrêt		
hauteur	8"	12"
distance du mur	60"	77"

Plus de repos dans les stalles larges



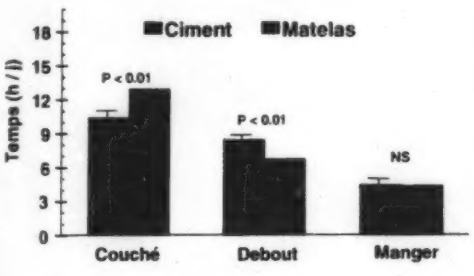
Stalles longues et larges = moins de temps debout, les membres avant dans la stalle



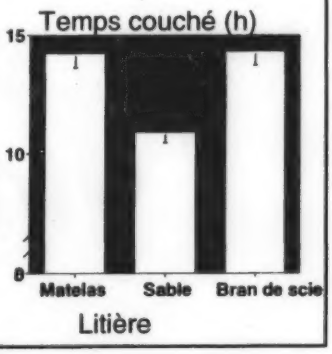
Confort de la vache et logettes - longueur et largeur

- Plus de temps couché dans les stalles larges
- moins de "semi-occupation" dans les stalles larges et longues
- pas d'effet sur la propreté des stalles

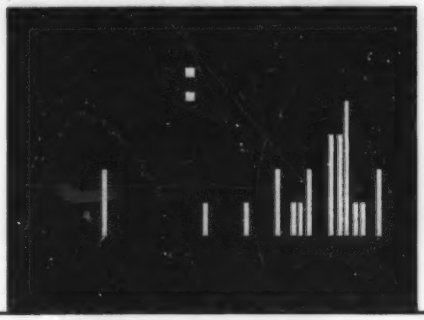
Les vaches sur géotextile passent 2,5 h de plus couchées



Les vaches passent moins de temps couchées sur le sable

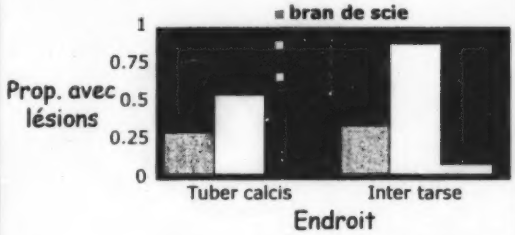


Les vaches varient dans leur réaction à la litière



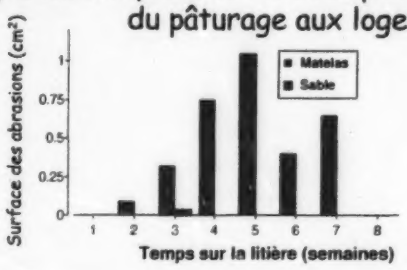
Blessures aux jarrets

Lésions plus fréquentes et plus graves sur les matelas



Taszkun & Weary, 2000

Les lésions se développent plus rapidement quand les vaches passent du pâturage aux logettes

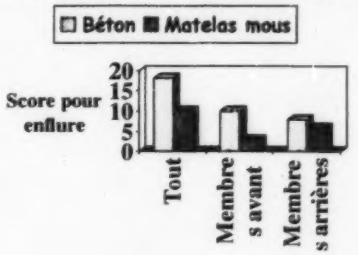


Blessure des jarrets

- Comparaisons inter-fermes
- Développement des lésions
- Prévenir les lésions
  - farine de chaux (325 mesh) dans litière: pas d'effet sur les blessures
  - plus de litière: moins de blessures et moins graves

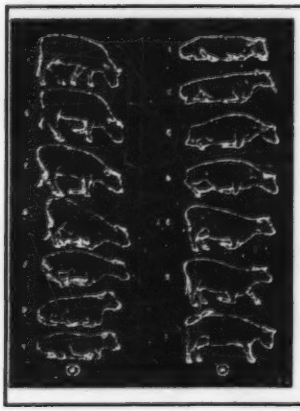
Enflure des genoux

Les vaches sur matelas mous ont moins d'enflure aux genoux/jarrets



Litière

- Moins d'enflure sur les matelas que sur le béton
- plus de lésions sur les matelas, surtout si peu de litière
- sable associé à moins de lésions mais aussi moins de temps couché ?
- variations individuelles dans les réactions
- nouveaux travaux sur la santé du pis



Biomécanique: comment les vaches se lèvent et se couchent

Confort des vaches : besoin de plus de recherche sur

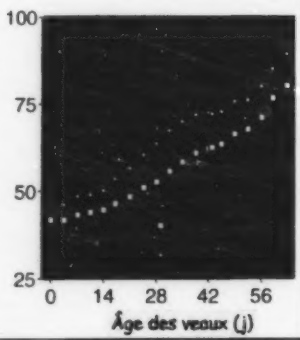
- Les surfaces où elles marchent - boiteries et fourbure (PLC)
- design des mangeoires
- taux d'occupation

Le programme en bien-être animal de UBC

Autre recherche en production laitière

- Élevage des veaux
  - Écornage
  - âge de séparation
  - alimentation au lait à volonté
  - logement en groupes
  - sevrage

Plus de lait aux veaux augmente beaucoup leur gain de poids



Merci!

Chercheurs: Dr. Mike Appleby, Dr. Steve Appleyard, Dr. Marek Gaworski, Dr. Jeremy Marchant, Dr. Job Matias, Dr. Iwona Taszkun,Erin Bell, Art Ceballos, Paul Faulkner, Frances Flower, Ruth Forde, Jennifer Jasper, Fritha Langford, Cassandra Tucker, Tamiko Thomas, Bev Chua, Eveline Coenen, Arend Hoekstra, Dominique Falconer, Sylvia Huang, Paul Jong, Melanie Lantz, Laura Mowbray, Jessica Paterson, Joyce van Delen, Fay Wan, Amanda Zimmerman

Donateurs: **CRSNG**, **BC SPCA**, **BC VMA**, ***PLC***, BCIDF, BC Dairy Foundation, etc.